



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07C 237/06, C07K 5/06, A61K 47/48, C12N 15/87, 15/88, A61K 48/00		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/18185 (43) Date de publication internationale: 22 mai 1997 (22.05.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01774		(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Date de dépôt international: 8 novembre 1996 (08.11.96)			
(30) Données relatives à la priorité: 95/13490 14 novembre 1995 (14.11.95) FR			
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).		Publiée Avec rapport de recherche internationale.	
(72) Inventeurs; et			
(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BYK, Gérardo [IL/FR]; 3, impasse Eugène-Delacroix, F-94000 Créteil (FR). SCHERMAN, Daniel [FR/FR]; 10, rue Erard, F-75012 Paris (FR). SCHWARTZ, Bertrand [FR/FR]; 13-15, rue Paul-Bert, F-94700 Maisons-Alfort (FR). DUBERTRET, Catherine [FR/FR]; 14, rue des Bruyères, F-92310 Sèvres (FR).			
(74) Mandataire: LE COUPANEC, Pascale; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).			

(54) Title: LIPOPOLYAMINES AS TRANSFECTION AGENTS AND PHARMACEUTICAL USES THEREOF

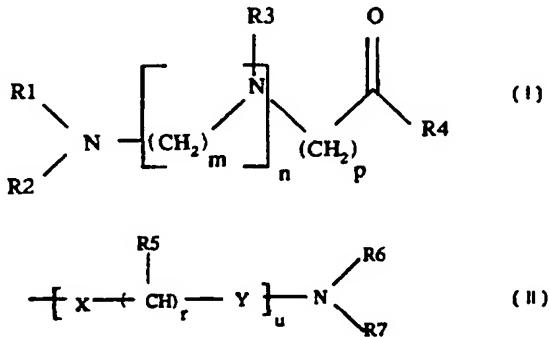
(54) Titre: LIPOPOLYMAMINES COMME AGENTS DE TRANSFECTION ET LEURS APPLICATIONS PHARMACEUTIQUES

(57) Abstract

Lipopolyamines of formula (I), wherein each of R1, R2 and R3, which are the same or different, is a hydrogen atom or a -(CH₂)_q-NRR' grouping, where q is independently 1, 2, 3, 4, 5 or 6 for each of the groupings R1, R2 and R3; each of m, n and p, which are the same or different, is an integer from 0 to 6; and R4 is a grouping of general formula (II), wherein each of R6 and R7, which are the same or different, is a hydrogen atom or a saturated or unsaturated C10-22 aliphatic radical, with the proviso that at least one of the two groupings is not hydrogen, u is an integer from 0 to 10, X is an oxygen or sulphur atom or an optionally monoalkylated amine grouping, Y is a carbonyl or methylene grouping, R5 is a hydrogen atom or an optionally substituted natural amino acid side chain, and r is an integer from 1 to 10, with the proviso that when r is 1, R5 is an optionally substituted natural amino acid side chain, and when r is more than 1, R5 is a hydrogen atom, are disclosed. Pharmaceutical compositions containing said lipopolyamines, and the use thereof for *in vitro* or *in vivo* nucleic acid transfection in cells, are also disclosed.

(57) Abrégé

La présente invention se rapporte à des lipopolyamines de formule (I) dans laquelle R1, R2 et R3 représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement-(CH₂)_q-NRR'. q pouvant varier entre 1, 2, 3, 4, 5 et 6 ceci de manière indépendante entre les différents groupements R1, R2 et R3; m, n et p représentent, indépendamment l'un de l'autre, un nombre entier pouvant varier entre 0 et 6; R4 représente un groupement de formule générale (II) dans laquelle R6 et R7 représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un radical aliphatique, saturé ou non, en C10 à C22 avec au moins l'un des deux groupements étant différent de l'hydrogène; u est un nombre entier choisi entre 0 et 10; X représente un atome d'oxygène, de soufre ou un groupement amine monoalkylé ou non; Y représente un groupement carbonyle ou un groupement méthylène; R5 représente un atome d'hydrogène ou une chaîne latérale d'acide amine naturel, le cas échéant substituée et r représente un entier variant entre 1 et 10 avec lorsque r est égal à 1, R5 représentant une chaîne latérale d'acide氨基自然 substitué ou non et lorsque r est supérieur à 1, R5 représentant un atome d'hydrogène. Elle concerne également des compositions pharmaceutiques les contenant et leurs applications pour la transfection d'acides nucléiques, *in vitro* ou *in vivo* dans des cellules.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Liberia	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lithuanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettone	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

LIPOPOLYAMINES COMME AGENTS DE TRANSFECTION ET LEURS APPLICATIONS PHARMACEUTIQUES

La présente invention concerne de nouveaux composés apparentés à la famille des lipopolyamines, des compositions pharmaceutiques les contenant, leurs applications pour la transfection *in vivo* et/ou *in vitro* d'acides nucléiques et leur procédé de préparation.

De nombreuses maladies génétiques sont associées à un défaut d'expression et/ou une expression anormale, c'est à dire déficiente ou excessive, d'un ou plusieurs acides nucléiques. La thérapie génique a pour principal objectif de corriger ce type d'anomalies génétiques par le biais de l'expression cellulaire *in vivo* ou *in vitro* de gènes clonés.

Aujourd'hui, plusieurs méthodes sont proposées pour la délivrance intracellulaire de ce type d'information génétique. L'une d'entre elles, en particulier, repose sur l'emploi de vecteurs chimiques ou biochimiques. Les vecteurs synthétiques ont deux fonctions principales, compacter l'ADN à transfacter et promouvoir sa fixation cellulaire ainsi que son passage à travers la membrane plasmique et, le cas échéant, à travers les deux membranes nucléaires.

Un progrès important a été accompli dans ce mode de transfection avec le développement d'une technologie basée sur l'emploi d'un lipide cationique. Il a ainsi été mis en évidence qu'un lipide cationique chargé positivement, le chlorure de N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium (DOTMA), interférait, sous la forme de liposomes ou de petites vésicules, spontanément avec de l'ADN, qui est chargé négativement, pour former des complexes lipides-ADN, capables de fusionner avec les membranes cellulaires, et permettait ainsi la délivrance intracellulaire de l'ADN. Toutefois, bien que cette molécule soit efficace au niveau de la transfection, elle présente le désavantage d'être non biodégradable et de posséder un caractère毒ique à l'égard des cellules.

Depuis le DOTMA, d'autres lipides cationiques ont été développés sur ce modèle de structure : groupe lipophile associé à un groupement amino via un bras dit "spacer". Parmi ceux-ci, on peut plus particulièrement citer ceux comprenant à titre de groupement lipophile deux acides gras ou un dérivé du cholestérol, et comportant, en outre, le cas échéant, à titre de groupement amino, un groupement d'ammonium

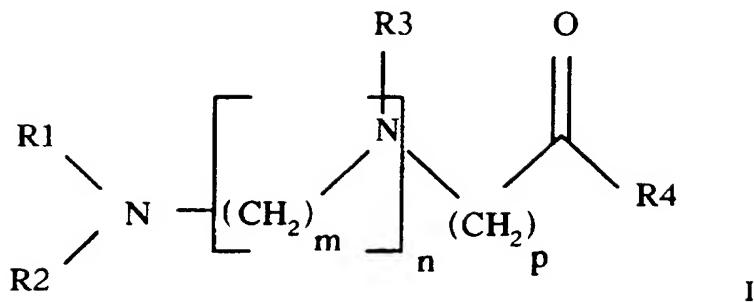
- quaternaire. Les DOTAP, DOBT ou le ChOTB peuvent notamment être cités à titre représentatifs de cette catégorie de lipides cationiques. D'autres composés, comme les DOSC et ChOSC, se caractérisent par la présence d'un groupement choline à la place du groupement d'ammonium quaternaire. En général, l'activité transfectante de ces 5 composés demeure toutefois assez faible.

Une autre catégorie de lipides cationiques, les lipopolyamines, a également été décrite. Au sens de la présente invention, le terme lipopolyamine désigne une molécule amphiphile comprenant au moins une région hydrophile polyamine associée par une région dite spacer à une région lipophile. La région polyamine des lipopolyamines, 10 chargée cationiquement, est capable de s'associer de manière réversible avec l'acide nucléique, chargé négativement. Cette interaction compacte fortement l'acide nucléique. La région lipophile rend cette interaction ionique insensible au milieu externe, en recouvrant la particule nucléolipidique formée d'une pellicule lipidique. Dans ce type de composés, le groupement cationique peut être représenté par 15 le radical L-5carboxyspermine qui contient quatre groupements d'ammonium, deux primaires et deux secondaires. Les DOGS et DPPES en font notamment partie. Ces lipopolyamines sont tout particulièrement efficaces pour la transfection de cellules endocrines primaires.

En fait, un agent de transfection synthétique idéal devrait présenter un haut 20 niveau de transfection, et ce pour un large spectre de cellules, posséder une toxicité nulle ou à défaut une toxicité très minimisée aux doses d'utilisation, et enfin, être biodégradable pour s'affranchir de tout effet secondaire au niveau des cellules traitées.

La présente invention a précisément pour objet de proposer de nouvelles 25 lipopolyamines, originales de par leur fraction polyamine, et qui soient susceptibles d'être utilisés efficacement dans la transfection *in vitro* et ou *in vivo* de cellules et notamment pour la vectorisation d'acides nucléiques.

La présente invention a pour premier objet des lipopolyamines, sous forme D, L ou LD et leurs sels caractérisées en ce qu'elles sont représentées par la formule générale I



Dans laquelle :

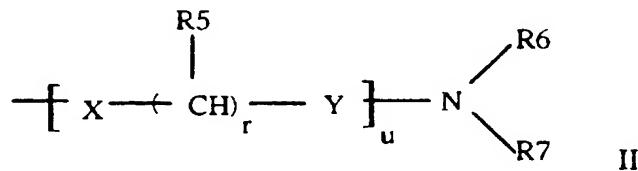
R1, R2 et R3 représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement $-(CH_2)^q-NRR'$ avec

5 q pouvant varier entre 1, 2, 3, 4, 5 et 6 ceci de manière indépendante entre les différents groupements R1, R2 et R3 et

R et R' représentant indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement $-(CH_2)^{q'}-NH_2$, q' pouvant varier entre 1, 2, 3, 4, 5 et 6 ceci de manière indépendante entre les différents groupements R et R',

10 m, n et p représentent, indépendamment l'un de l'autre, un nombre entier pouvant varier entre 0 et 6 avec lorsque n est supérieur à 1, m pouvant prendre des valeurs différentes et R3 des significations différentes au sein de la formule générale I et

R4 représente un groupement de formule générale II



15 dans laquelle:

R6 et R7 représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un radical aliphatique, saturé ou non, en C10 à C22 avec au moins l'un des deux groupements étant différent de l'hydrogène,

u est un nombre entier choisi entre 0 et 10 avec lorsque u est un entier supérieur à 1
R5, X, Y et r pouvant avoir des significations différentes au sein des différents motifs [
X-(CHR5)r-Y]

X représente un atome d'oxygène, de soufre ou un groupement amine monoalkylé ou
5 non,

Y représente un groupement carbonyle ou un groupement méthylène

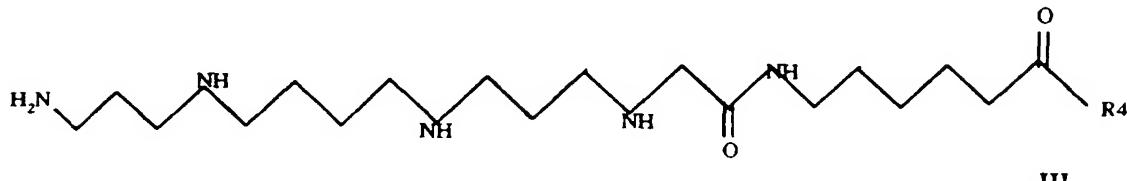
R5 représente un atome d'hydrogène ou une chaîne latérale d'acide aminé naturel, le cas échéant substituée et

10 r représente un entier variant entre 1 et 10 avec lorsque r est égal à 1, R5 représentant une chaîne latérale d'acide aminé naturel et lorsque r est supérieur à 1, R5 représentant un atome d'hydrogène.

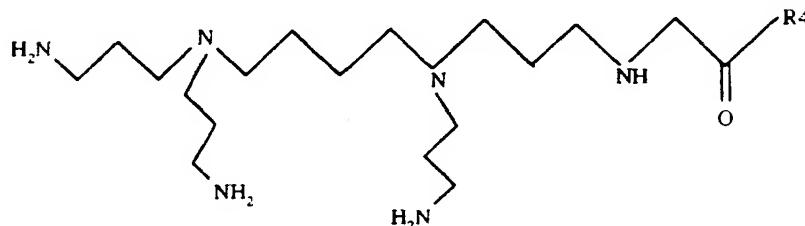
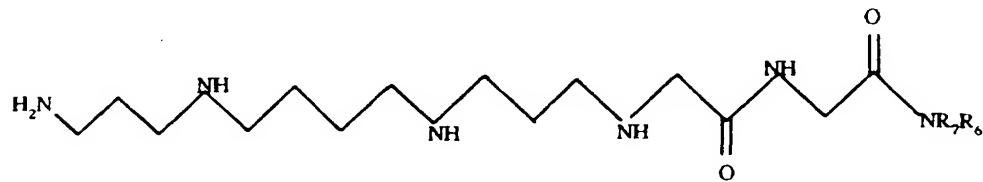
A titre de chaîne latérale d'acide aminé naturel on entend notamment désigné au sens de l'invention des chaînes contenant des motifs amidinium comme par exemple la chaîne latérale de l'arginine. Comme il l'est énoncé précédemment cette 15 chaîne peut être substituée par des groupements aliphatiques saturés ou insaturés, linéaires, ramifiés ou cycliques en C1 à C24 tels par exemple des radicaux cholestéryle, arachidonyle ou rétinoyle, des groupements mono- ou poly-aromatiques tels par exemple des dérivés benzyloxycarbonyles, benzyle esters, rhodaminyle substitués ou non.

20 Ces nouveaux produits de formule générale (I) peuvent se présenter sous forme de sels non toxiques et pharmaceutiquement acceptables. Ces sels non toxiques comprennent les sels avec les acides minéraux (acides chlorhydrique, sulfurique, bromhydrique, phosphorique, nitrique) ou avec les acides organiques (acides acétique, propionique, succinique, maléique, hydroxymaléique, benzoïque, 25 fumarique, méthanesulfonique ou oxalique) ou avec les bases minérales (soude, potasse, lithine, chaux) ou organiques (amines tertiaires comme la triéthylamine, la pipéridine, la benzylamine).

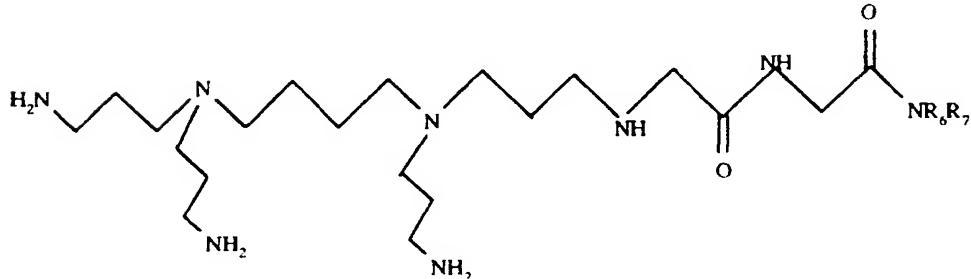
A titre représentatif des composés selon l'invention on peut plus particulièrement citer les composés de sous-formules suivantes:



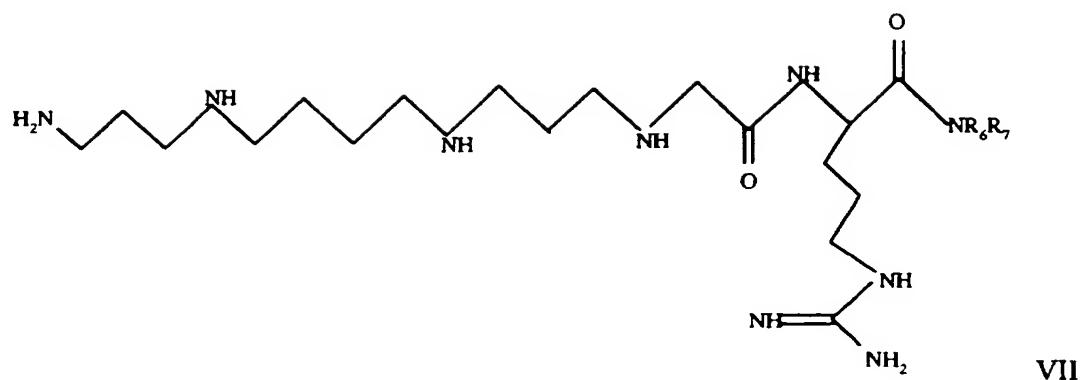
5



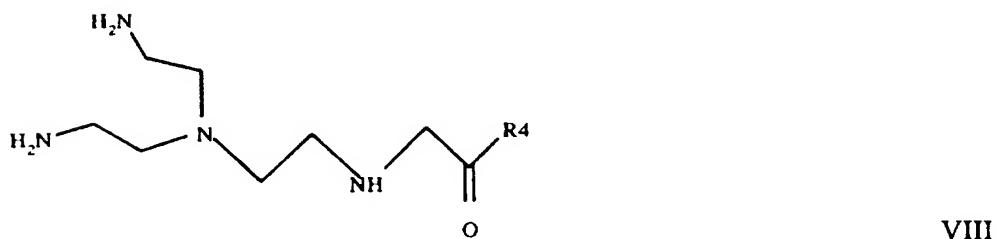
10



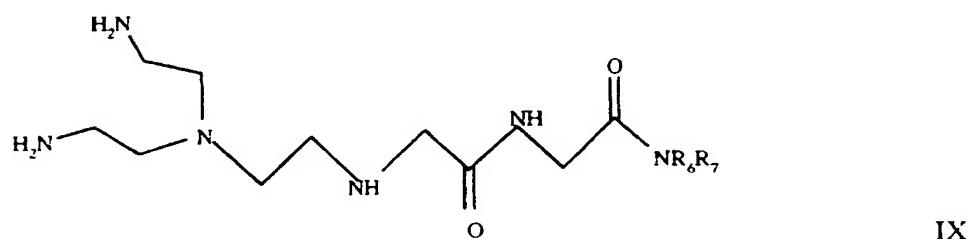
6



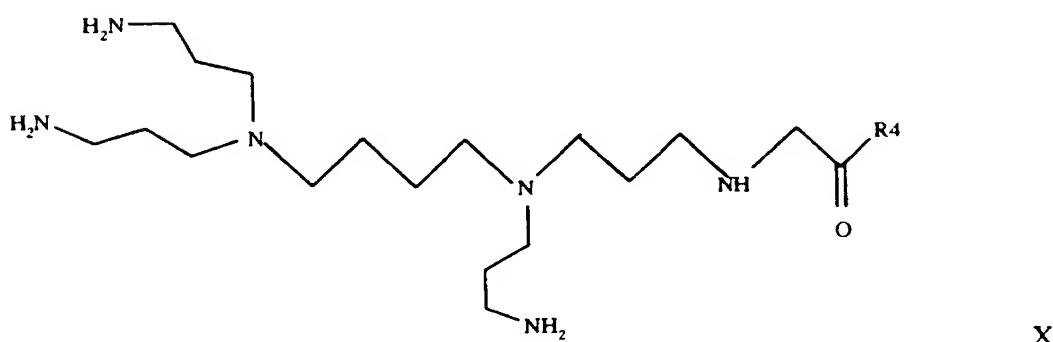
VII



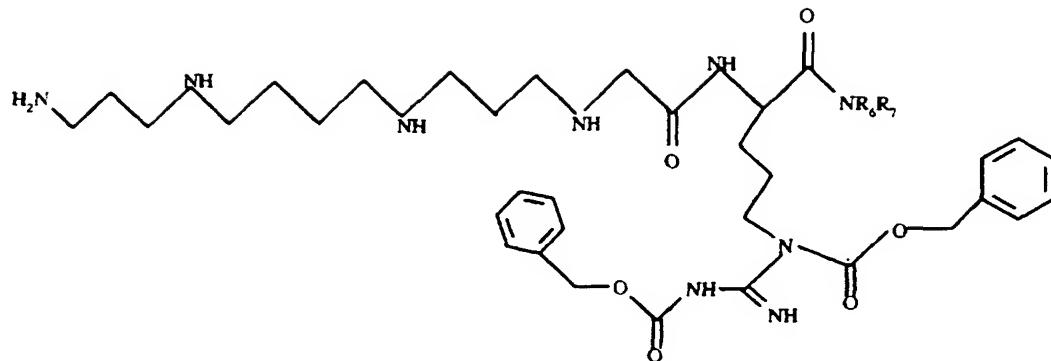
VIII



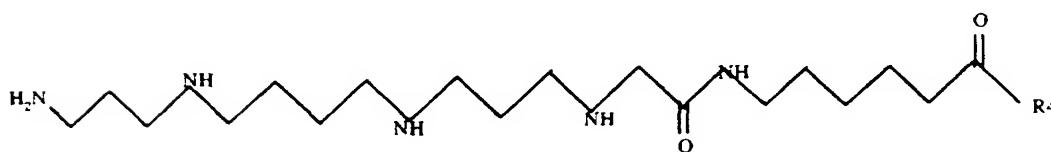
IX



X



XI



5

XII

dans lesquelles R4, R6 et R7 possèdent les définitions précédentes. Préférentiellement, R4 y représente un groupement NR₆R₇ avec R₆ et R₇ figurant dans les sous formules III à XII un groupement identique choisi parmi (CH₂)₁₇CH₃, (CH₂)₁₁CH₃, (CH₂)₁₃CH₃ ou (CH₂)₁₂CH₃.

10

Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux, les composés revendiqués comprennent en outre un élément de ciblage permettant d'orienter le transfert de l'acide nucléique auquel ils sont associés. Cet élément de ciblage est de préférence incorporer, sur le composé de formule générale I, au niveau de la chaîne latérale d'acide aminé figurée par le substituant R₅. Plus préférentiellement, l'élément de ciblage est lié, de manière covalente ou non covalente, au composé selon l'invention.

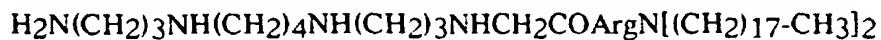
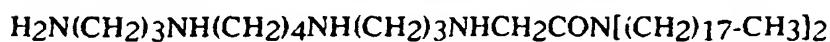
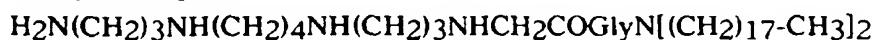
Il peut s'agir d'un élément de ciblage extracellulaire, permettant d'orienter le transfert de l'acide nucléique vers certains types cellulaires ou certains tissus souhaités

(cellules tumorales, cellules hépatiques, cellules hématopoïétiques, etc). A ce titre, il peut s'agir d'un ligand de récepteur cellulaire présent à la surface du type cellulaire ciblé comme par exemple un sucre, un folate, une transférrine, une insuline, une protéine asialo-etrosomucoïde ou toute molécule bioactive reconnue par des récepteurs extracellulaires. Il peut également s'agir d'un élément de ciblage intracellulaire, permettant d'orienter le transfert de l'acide nucléique vers certains compartiments cellulaires privilégiés (mitochondries, noyau, etc) comme par exemple, une séquence signal de localisation nucléaire, (nls), qui priviliege l'accumulation de l'ADN transfecté au sein du noyau.

Plus généralement, les éléments de ciblage susceptibles d'être mis en oeuvre dans le cadre de l'invention incluent les sucres, les peptides, les oligonucléotides, les stéroïdes ou les lipides. Préférentiellement, il s'agit de sucres et/ou peptides tels que des anticorps ou fragments d'anticorps, des ligands de récepteurs cellulaires ou des fragments de ceux-ci, des récepteurs ou fragments de récepteurs, etc. En particulier, il peut s'agir de ligands de récepteurs de facteurs de croissance, de récepteurs de cytokines, de récepteurs de lectines cellulaires ou de récepteurs de protéines d'adhésion telles que les intégrines. On peut également citer le récepteur de la transférrine, des lipides HDL et des LDL. L'élément de ciblage peut également être un sucre permettant de cibler des lectines tels que les récepteurs asialoglycoprotéiques, ou encore un fragment Fab d'anticorps permettant de cibler le récepteur du fragment Fc des immunoglobulines.

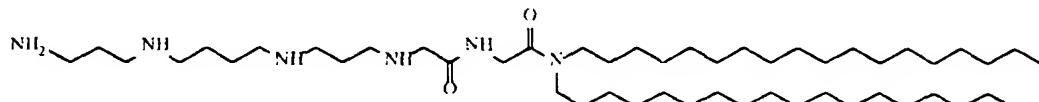
De la même façon, il est possible d'envisager l'association à un composé de formule générale I d'un agent marqueur de type biotine, rhodamine, folate par exemple sur la chaîne latérale d'acide aminé R5. Cet agent marqueur peut également être une séquence peptidique ou pseudopeptidique linéaire ou cyclique comportant l'épitope Arg-Gly-Asp de reconnaissance des récepteurs primaires et/ou secondaires des protéines d'adhésion du type intégrines.

A titre illustratif des lipopolyamines revendiquées, on peut plus particulièrement citer les composés suivants, décrits de manière plus détaillée dans les exemples ci-après:



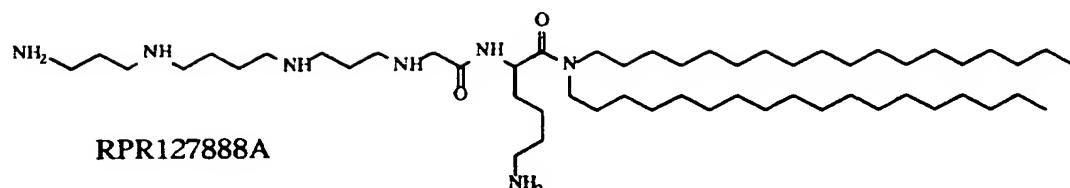
$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COArg(Z)}_2\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COLys(rhodamine)}\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COLys(biotinyl)}\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\{ \text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3 \} _2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{N} \{ (\text{CH}_2)_3\text{NH}_2 \} (\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlyN}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
5 $\{ \text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3 \} _2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{N} \{ (\text{CH}_2)_3\text{NH}_2 \} (\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{CON}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\{ \text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2 \} _2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{NHCH}_2\text{COGlyN}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\{ \text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2 \} _2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{NHCH}_2\text{CON}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{N}[(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2]\text{CH}_2\text{COGlyN}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COLysN}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
10 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COLys [Cl-Z]N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COLys [CHO]N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COLys [Cholesteryl]N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COLys [Arachidonyl]N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGluN}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
15 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu [N(CH}_3)_2\text{]N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu [O-Bz]N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu [Galactosamide]N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu [Glucosamide]N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu [Mannosamide]N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
20 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{CON}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{CON}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlyN}[(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlyN}[(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3]_2$ et
25 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlyN}[(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3]_2$

A titre de composés particulièrement représentatifs de la présente invention on peut plus notamment citer dont la formule générale est représentée ci-après.



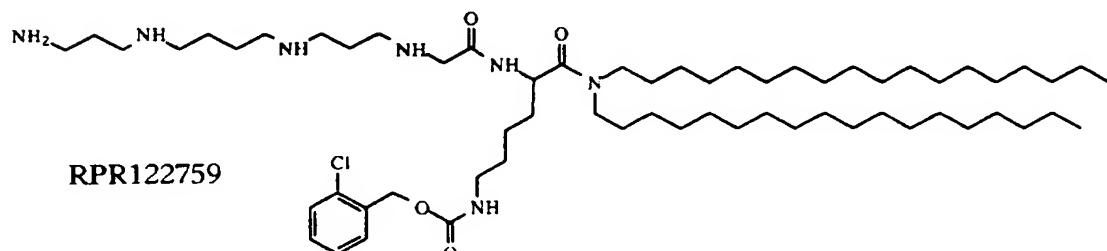
RPR120535

10



RPR127888A

(21)



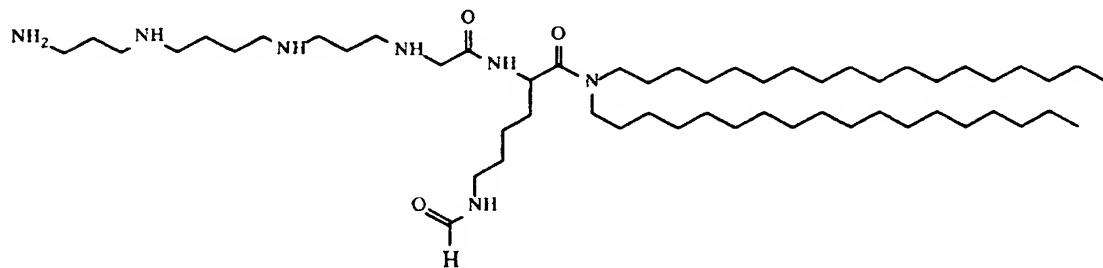
RPR122759

5

(22)

10

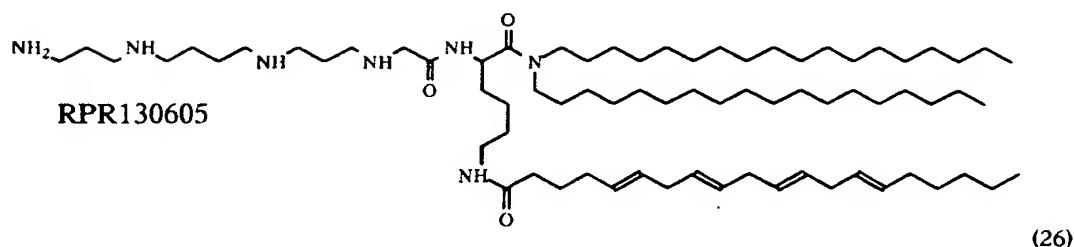
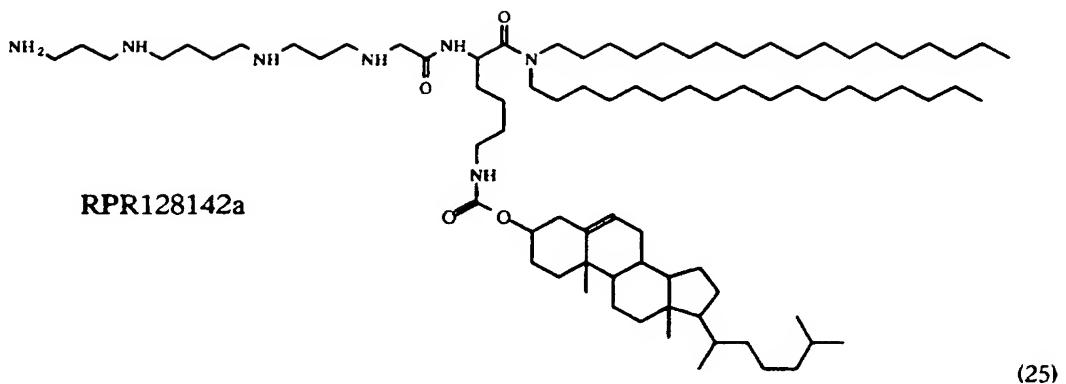
RPR 122760A



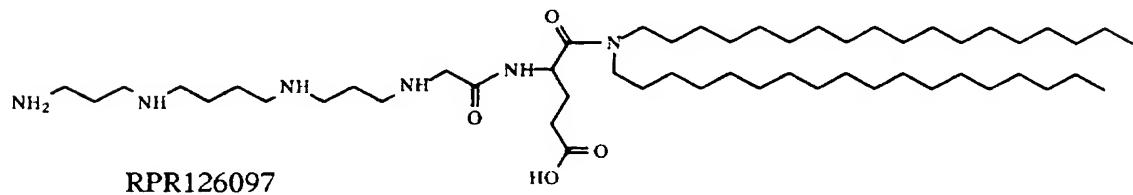
(24)

15

11

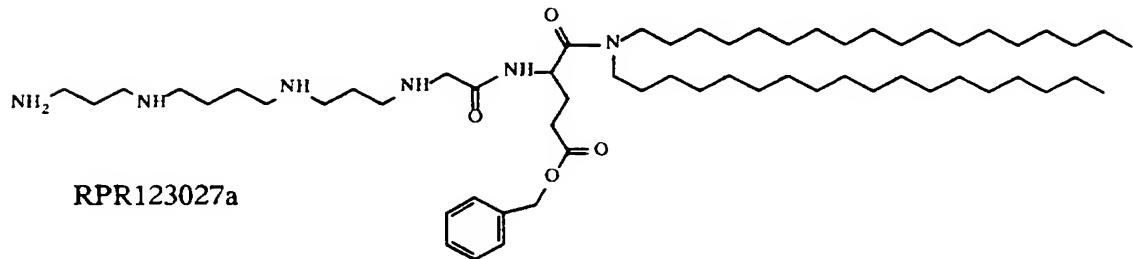


5



10

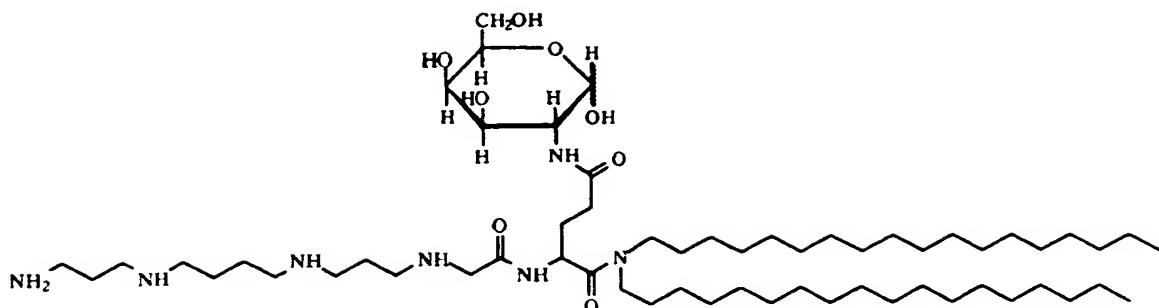
(28)



15

(29)

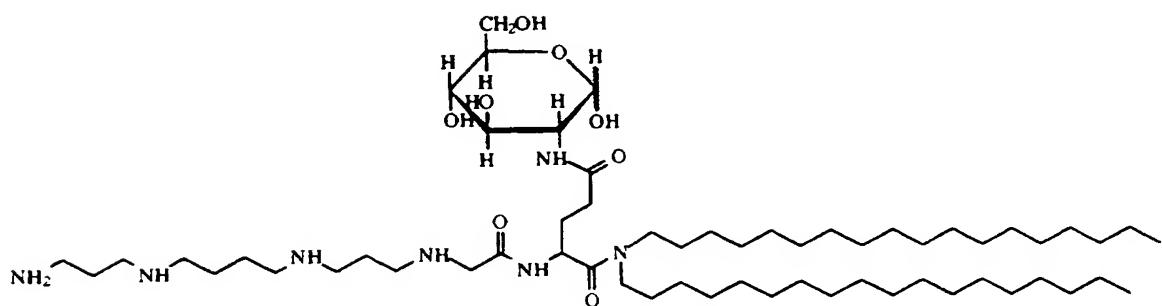
12



RPR130596a

(31)

5

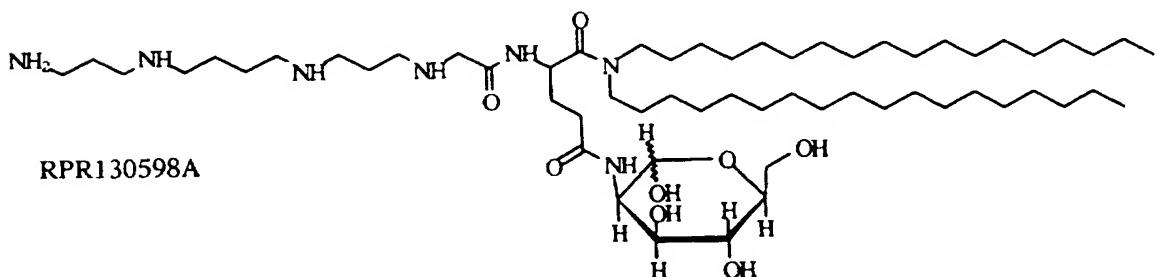


RPR130595A

(32)

10

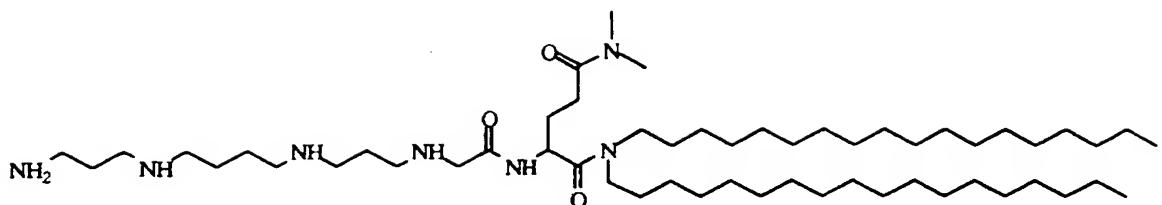
15



(33)

20

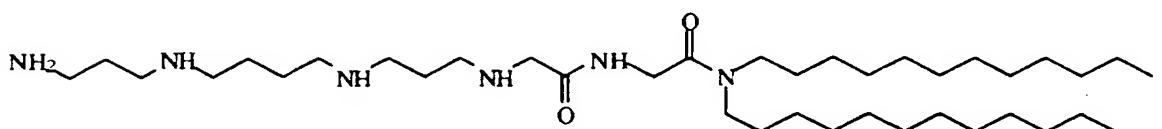
13



RPR131111a

(34)

5

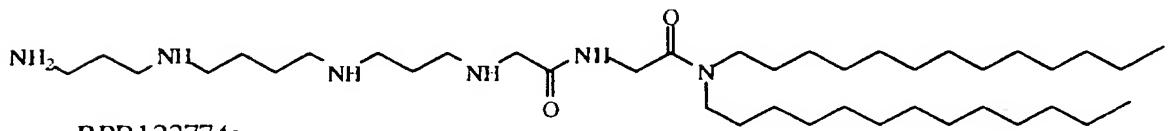


10

RPR122767a

(35)

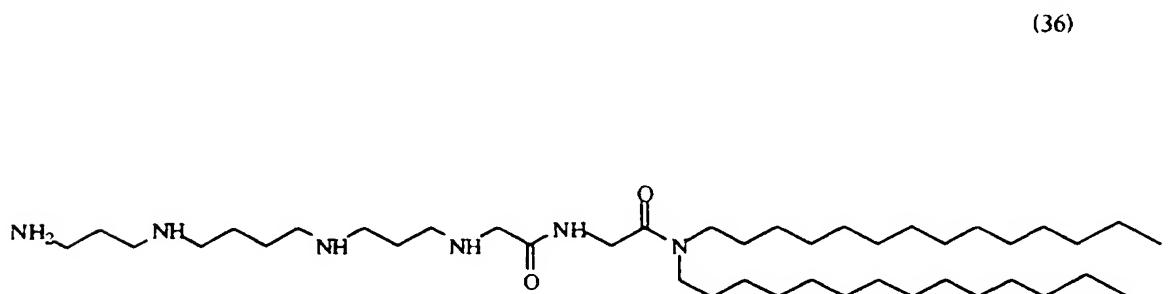
15



20

RPR122774a

(36)



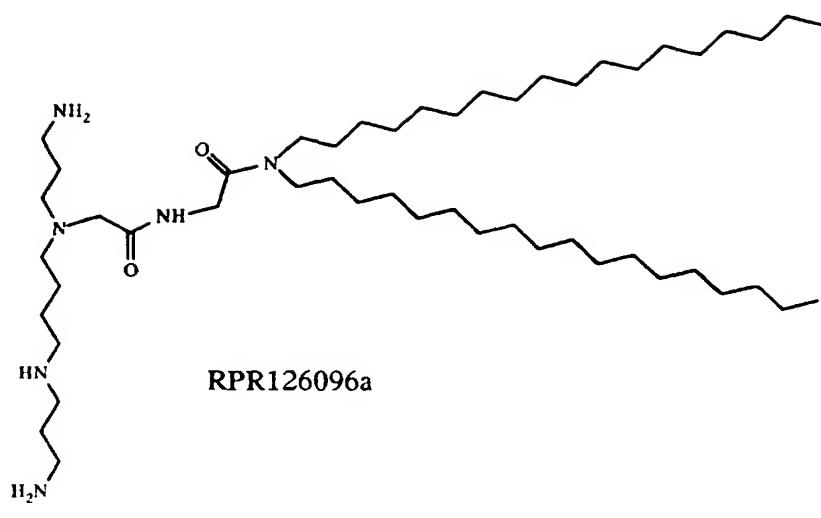
25

RPR122766a

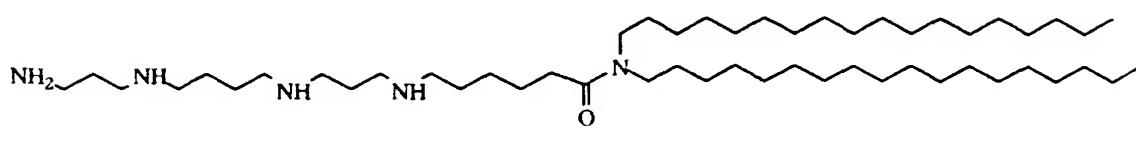
(37)

30

14

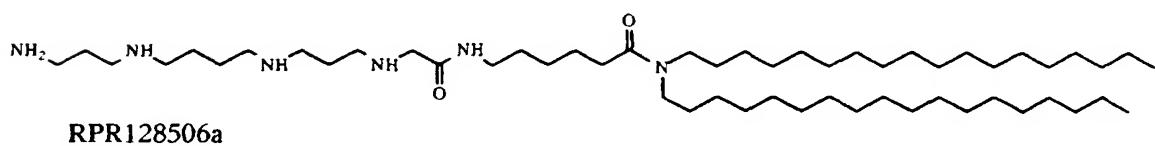


5



(41)

10



(42)

15

Dans le cadre de la présente invention, il a en outre été développé une méthodologie originale en phase solide pour préparer des polyamines fonctionnalisées assymétriques dont dérivent les lipopolyamines selon l'invention.

20

Classiquement, l'accès aux polyamines fonctionnalisées assymétriques est limité par la nécessité d'introduire sélectivement des modifications dans des polyamines symétriques linéaires ou branchées. Les différences chimiques entre les groupes aminés primaires et secondaires d'une polyamine requièrent une grande sélectivité pour effectuer des réactions telles que des alkylations, des additions de type Michael ou des acylations. De plus, la sélectivité imposée par de telles différences chimiques n'est pas compatible avec une alkylation selective dans un groupe de plusieurs amines primaires et secondaires, comme on en rencontre dans les polyamines. La réponse classique à de telles restrictions est de construire les polyamines fonctionnalisées assymétriques à partir de blocs monomères portant d'un côté un groupe aminé susceptible d'être "polyaminé" et de l'autre côté la fonction asymétrique convenablement protégée. Cette approche nécessite donc une stratégie de synthèse fastidieuse en plusieurs étapes et en particulier une protection orthogonale des groupes fonctionnels.

La méthode développée dans le cadre de la présente invention, a précisément pour objectif de s'affranchir des inconvénients rencontrés jusqu'alors avec ce type de synthèse. Elle a pour net avantage de conduire commodément et rapidement à des polyamines qui sont fonctionnalisées sélectivement sur un unique groupe aminé primaire par alkylation ou alkylation réductive des polyamines symétriques.

Le principe du procédé revendiqué est fondé sur l'emploi d'une méthode de synthèse en phase solide pour favoriser une réaction bimoléculaire entre le réactif alkylant et la polyamine, ce qui évite la polyalkylation de celle-ci. Plus précisément, la présente invention se rapporte à un procédé caractérisé en ce qu'il met en oeuvre le couplage d'au moins une fraction lipidique à au moins une fraction polyamine assymétrique, ladite fraction polyamine ayant au préalable été obtenue par réaction bimoléculaire entre un agent alkylant lié covallement à un support solide et une polyamine symétrique. Selon cette approche, le réactif alkylant est lié covallement à un support polymère par estérification ou amidation. La polyamine symétrique réagit avec l'agent alkylant en phase solide par une réaction bimoléculaire qui mène à la polyamine assymétrique mono-fonctionnalisée attachée au support. Les amines libres du produit sont habituellement protégées en phase solide par des groupes protecteurs de type BOC ou Z, et finalement les produits sont clivés du support de phase solide. Ces acides polyaminés sont, comme il convient, couplés aux fractions lipidiques pour fournir les agents transfectants recherchés. Pour ce couplage, il est possible de mettre en oeuvre des agents de couplage peptidique usuels comme BOP, Pybop, BopCl et

- DCC par exemple. La méthodologie permet également d'assembler l'agent transfectant entier sur le support solide avec l'introduction éventuelle de peptides traceurs, de sucres, ou de sondes fluorescentes dans les molécules. Bien entendu, il s'avère possible de procéder à ce type de greffage sur la lipopolyamine libre.
- 5 La faisabilité de la méthode a été démontrée par la synthèse de plusieurs acides polyaminés linéaires ou branchés assymétriques et fonctionnalisés.

La présente invention a également pour objet toute application thérapeutique
10 des lipopolyamines telles que décrites précédemment, soit directement, soit au sein de compositions pharmaceutiques.

Comme explicité précédemment, les composés de formule générale I s'avèrent tout particulièrement intéressants pour la transfection *in vitro* et *in vivo* d'acides nucléiques. Ils compactent efficacement l'ADN et présentent avantageusement une toxicité très réduite.
15

Pour obtenir un effet maximal des compositions de l'invention, les proportions respectives du composé de formule générale I et de l'acide nucléique sont de préférence déterminées de manière à ce que le rapport R, charges positives de la lipopolyamine considérée par charges négatives dudit acide nucléique soit optimal. Ce rapport optimal variant en particulier selon le mode d'utilisation à savoir *in vivo* ou *in vitro* et selon le type cellulaire à transfacter, il est optimisé au cas par cas. Cette optimisation relève de la compétence de l'homme de l'art.
20

Dans les compositions pharmaceutiques de la présente invention, le polynucléotide peut être aussi bien un acide désoxyribonucléique qu'un acide ribonucléique. Il peut s'agir de séquences d'origine naturelle ou artificielle, et notamment d'ADN génomique, d'ADNc, d'ARNm, d'ARNt, d'ARNr, de séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou semi-synthétiques d'oligonucléotides modifiés ou non. Ces acides nucléiques peuvent être d'origine humaine, animale, végétale, bactérienne, virale, etc. Ils peuvent être obtenus par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par criblage de banques, par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques. Ils peuvent par ailleurs être incorporés dans des vecteurs, tels que des vecteurs plasmidiques.
25
30

Concernant plus particulièrement les acides désoxyribonucléiques, ils peuvent être simple ou double brin de même que des oligonucléotides courts ou des séquences plus longues. Ces acides désoxyribonucléiques peuvent porter des gènes thérapeutiques, des séquences régulatrices de la transcription ou de la réPLICATION, des 5 séquences antisens modifiées ou non, des régions de liaison à d'autres composants cellulaires, etc.

Au sens de l'invention, on entend par gène thérapeutique notamment tout gène codant pour un produit protéique ayant un effet thérapeutique. Le produit protéique ainsi codé peut être une protéine, un peptide, etc. Ce produit protéique peut 10 être homologue vis-à-vis de la cellule cible (c'est-à-dire un produit qui est normalement exprimé dans la cellule cible lorsque celle-ci ne présente aucune pathologie). Dans ce cas, l'expression d'une protéine permet par exemple de pallier une expression insuffisante dans la cellule ou l'expression d'une protéine inactive ou faiblement active en raison d'une modification, ou encore de surexprimer ladite 15 protéine. Le gène thérapeutique peut aussi coder pour un mutant d'une protéine cellulaire, ayant une stabilité accrue, une activité modifiée, etc. Le produit protéique peut également être hétérologue vis-à-vis de la cellule cible. Dans ce cas, une protéine exprimée peut par exemple compléter ou apporter une activité déficiente dans la cellule, lui permettant de lutter contre une pathologie, ou stimuler une réponse 20 immunitaire.

Parmi les produits thérapeutiques au sens de la présente invention, on peut citer plus particulièrement les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc (FR 9203120), les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les 25 facteurs trophiques : BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, HARP/pléiotrophine, etc la dystrophine ou une minidystrophine (FR 9111947), la protéine CFTR associée à la mucoviscidose, les gènes suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (FR 93 04745), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation : Facteurs VII, VIII, IX, les gènes intervenant dans la 30 réparation de l'ADN, les gènes suicides (thymidine kinase, cytosine déaminase), les gènes de l'hémoglobine ou d'autres transporteurs protéiques, les gènes correspondant aux protéines impliquées dans le métabolisme des lipides, de type apolipoprotéine choisie parmi les apolipoprotéines A-I, A-II, A-IV, B, C-I, C-II, C-III, D, E, F, G, H, J et apo(a), les enzymes du métabolisme comme par exemple la lipoprotéine lipase, la 35 lipase hépatique, la lécitine cholestérol acyltransférase, la 7 alpha cholestérol

hydroxylase, la phosphatidique acide phosphatase, ou encore des protéines de transfert de lipides comme la protéine de transfert des esters de cholestérol et la protéine de transfert des phospholipides, une protéine de liaisons des HDL ou encore un récepteur choisi par exemple parmi les récepteurs LDL, récepteurs des 5 chylomicrons-remnants et les récepteurs scavenger.etc.

L'acide nucléique thérapeutique peut également être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent, par exemple, être transcrrites dans la cellule cible en ARN complémentaires d'ARNm 10 cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet EP 140 308. Les gènes thérapeutiques comprennent également les séquences codant pour des ribozymes, qui sont capables de détruire sélectivement des ARN cibles (EP 321 201).

Comme indiqué plus haut, l'acide nucléique peut également comporter un ou 15 plusieurs gènes codant pour un peptide antigénique, capable de générer chez l'homme ou l'animal une réponse immunitaire. Dans ce mode particulier de mise en œuvre, l'invention permet donc la réalisation soit de vaccins soit de traitements immunothérapeutiques appliqués à l'homme ou à l'animal, notamment contre des microorganismes, des virus ou des cancers. Il peut s'agir notamment de peptides 20 antigéniques spécifiques du virus d'Epstein Barr, du virus HIV, du virus de l'hépatite B (EP 185 573), du virus de la pseudo-rage, du "syncitia forming virus", d'autres virus ou encore spécifiques de tumeurs (EP 259 212).

Préférentiellement, l'acide nucléique comprend également des séquences 25 permettant l'expression du gène thérapeutique et/ou du gène codant pour le peptide antigénique dans la cellule ou l'organe désiré. Il peut s'agir des séquences qui sont naturellement responsables de l'expression du gène considéré lorsque ces séquences sont susceptibles de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de séquences d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes 30 eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs des gènes E1A, MLP, CMV, RSV, etc. En outre, ces séquences

d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, etc. Il peut aussi s'agir de promoteur, inductible ou répressible.

Par ailleurs, l'acide nucléique peut également comporter, en particulier en amont du gène thérapeutique, une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du produit thérapeutique, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle. L'acide nucléique peut également comporter une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé vers un compartiment particulier de la cellule.

10 Dans un autre mode de mise en oeuvre, la présente invention concerne des compositions comprenant un acide nucléique, une lipopolyamine telle que revendiquée et un adjuvant capable de s'associer au complexe lipopolyamine/acide nucléique et d'en améliorer le pouvoir transfectant. La demanderesse a en effet montré que le pouvoir transfectant des lipopolyamines peut être de manière inattendue augmenté en présence 15 de certains adjuvants (lipides, peptides ou protéines par exemple), capables de s'associer au complexe lipopolyamine/acide nucléique.

Dans cette optique, les compositions de l'invention peuvent comprendre comme adjuvant, un ou plusieurs lipides neutres. De telles compositions sont particulièrement avantageuses, notamment lorsque le rapport R est faible. La 20 demanderesse a en effet montré que l'addition d'un lipide neutre permet d'améliorer la formation des particules nucléolipidiques et, de manière surprenante, de favoriser la pénétration de la particule dans la cellule en déstabilisant sa membrane.

Plus préférentiellement, les lipides neutres utilisés dans le cadre de la présente invention sont des lipides à 2 chaînes grasses.

25 De manière particulièrement avantageuse, on utilise des lipides naturels ou synthétiques, zwitterioniques ou dépourvus de charge ionique dans les conditions physiologique. Il peuvent être choisis plus particulièrement parmi la dioleoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), l' oléoyl-palmitoylphosphatidyléthanolamine (POPE), les di-stéaroyl-, -palmitoyl, -mirystoyl 30 phosphatidyléthanolamines ainsi que leurs dérivé N-méthylés 1 à 3 fois; les phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les cérébroside (tels que notamment les galactocérebrosides), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines) ou encore les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et GM2).

Ces différents lipides peuvent être obtenus soit par synthèse, soit par extraction à partir d'organes (exemple : le cerveau) ou d'oeufs, par des techniques classiques bien connues de l'homme du métier. En particulier, l'extraction des lipides naturels peut être réalisée au moyen de solvants organiques (voir également Lehninger, 5 Biochemistry).

Très récemment, la demanderesse a démontré qu'il était également particulièrement avantageux d'employer à titre d'adjvant, un composé intervenant ou non directement au niveau de la condensation dudit acide nucléique (WO96/25508).

10 La présence d'un tel composé, au sein d'une composition transfectante à base d'une lipopolyamine, permettait de diminuer considérablement la quantité en cet agent, avec les conséquences bénéfiques qui en découlent sur le plan toxicologique, sans porter un préjudice quelconque à l'activité transfectante de ladite composition. Au contraire, celle-ci possède avantageusement un niveau de transfection supérieur.

15 Par composé intervenant au niveau de la condensation de l'acide nucléique, on entend définir un composé compactant, directement ou non, l'acide nucléique. Plus précisément, ce composé peut soit agir directement au niveau de l'acide nucléique à transfacter soit intervenir au niveau d'un composé annexe qui lui est directement impliqué dans la condensation de cet acide nucléique. De préférence, il agit 20 directement au niveau de l'acide nucléique.

Selon un mode de réalisation préféré, cet agent intervenant au niveau de la condensation de l'acides nucléique est constitué, en tout ou partie, de motifs peptidiques (KTPKKAKKP) et/ou (ATPAKCAA), le nombre des motifs pouvant varier entre 2 et 10. Dans la structure du composé selon l'invention, ces motifs peuvent 25 être répétés de manière continue ou non. C'est ainsi qu'ils peuvent être séparés par des liens de nature biochimique, par exemple un ou plusieurs acides aminés ou de nature chimique. Un tel agent peut également dériver en tout ou partie d'une histone, d'une nucléoline, d'une protamine et/ou de l'un de leurs dérivés.

30 Préférentiellement, les compositions de l'invention comprennent de 0,01 à 20 équivalents d'adjvant pour un équivalent d'acides nucléiques en poids/poids et, plus préférentiellement, de 0,5 à 5.

Les compositions selon l'invention peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, cutanée, orale, rectale, vaginale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe au niveau de l'organe désiré, ou pour une administration par voie topique (sur peau et/ou muqueuse). Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Les doses d'acide nucléique utilisées pour l'injection ainsi que le nombre d'administrations peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. En ce qui concerne plus particulièrement le mode d'administration, il peut s'agir soit d'une injection directe dans les tissus ou les voies circulatoires, soit d'un traitement de cellules en culture suivi de leur réimplantation *in vivo*, par injection ou greffe.

La présente invention fournit ainsi une méthode particulièrement avantageuse pour le traitement de maladies, comprenant l'administration *in vivo* ou *in vitro* d'un acide nucléique apte à corriger ladite maladie associé à un composé de formule générale I dans les conditions définies ci-dessus. Plus particulièrement, cette méthode est applicable aux maladies résultant d'une déficience en un produit protéique ou nucléique et l'acide nucléique administré code pour ledit produit protéique ou contient ledit produit nucléique.

Elle s'étend à toute utilisation d'une lipopolyamine selon l'invention pour la transfection *in vivo* ou *in vitro* de cellules.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples et figures qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

30 **FIGURES**

Figure (1): Mesure de l'efficacité de transfection après traitement de cellules NIH 3T3 (cellules embryonnaires de souris - fibroblastes) par différents lipides cationiques.

Figure (2) : Mesure de l'efficacité de transfection après traitement de cellules SMC lapin (culture primaire de cellules musculaires lisses d'aorte de lapin) par différents lipides cationiques.

5 Figure (3) : Mesure de l'efficacité de transfection après traitement de cellules 3LL (carcinome pulmonaire de Lewis) par différents lipides cationiques.

Figure (4) : Mesure de l'efficacité de transfection après traitement de cellules NIH 3T3 (cellules embryonnaires de souris - fibroblastes) par différents lipides cationiques.

10 Figure (5) : Effet de la concentration en DOPE sur l'efficacité de transfection de cellules 3LL.

Figure (6) : Transfection de cellules NIH 3T3 avec des quantités variables d'ADN et un ratio nanomoles lipofectant/ μ g d'ADN constant.

15 ABREVIATIONS ET SYMBOLES

AcOEt :	Acétate d' éthyle
BOC	t-Butoxycarbonyl
BOP :	Benzotriazol-1-yloxytris (diméthylamino) phosphonium hexafluorophosphate
20 DCC :	Dicyclohexylcarbodiimide
DCU :	Dicyclohexylurée
DMAP :	4-Diméthylaminopyridine
DMF :	Diméthylformamide
25 DMSO :	Diméthyle sulfoxide
DODA :	Diocadécylamine
EP :	Ether de pétrole
EtOH :	Ethanol
NEt ₃ :	Triéthylamine
30 Rf :	Coefficient de rétention frontal
TFA :	Acide trifluoroacétique
THF :	Tétrahydrofurane
TMS :	Tétraméthylsilane
UV :	Ultra-Violets
35 SPPS:	Solid Phase Peptide Synthesis
CLHP:	Chromatographie Liquide à Haute Pression
Z:	Benzoyloxycarbonyl
CIZ:	p-Chlorobenzoyloxycarbonyl

A- MATERIELS ET METHODES POUR LES SYNTHESES CHIMIQUES**1 MATERIEL****a) Composés**

5 - Les polyamines de départ sont disponibles commercialement, par exemple: spermidine, spermine, tris (2-aminoéthyle) amine, phénylène-diamine, diaminoéthane (propane, butane, pentane, hexane, etc.), ou peuvent être synthétisées par des méthodes classiques, par exemple par cyanoéthylation exhaustive d'amines disponibles dans le commerce telles que les diamino-éthane (propane, butane, pentane, hexane, etc.) amine, spermidine, spermine pour donner des polyamines branchées.

10 - Les agents alkylants sont choisis en fonction de la méthode d'alkylation comme suit:
Pour une alkylation classique: l'acide bromoacétique, les acides ω -halogéno carboxyliques.
Pour une alkylation réductive: un acide ω -aldéhyde-carboxylique, tel que l'acide glyoxalique, le semi-aldéhyde succinique,etc., ou un céto-acide tel que l'acide acéto-acétique ou l'acide pyruvique, etc.

15 - Les polymères utilisés sont des résines disponibles dans le commerce pour la synthèse peptidique en phase solide (synthèse de Merrifield), par exemple la résine d'O-Chlorotriyl chlorure, la résine HMP, qui fournissent des produits portant des fonctions acides libres ou une résine de type Rink. Les acides polyaminés peuvent être synthétisés directement sur un peptide présynthétisé sur la phase solide et portant une fonction bromo-alkyl ou un acide ω -aldéhyde.

20 - Les dioctadecylamine, triethylamine, trifluoroacétique, BOP, DMAP, chloroformate de benzyle de chez Aldrich.sont des produits commerciaux. Les solutions de NaCl et NaHCO₃ sont saturées; la solution de KHSO₄ est de 0.5 M

25

b) Mesures Physiques.

Les spectres de RMN Proton ont été enregistrés sur des spectromètres Bruker 400 et 600 MHZ.

30 Les spectres de masse ont été réalisés sur un API-MS/III.

c) Techniques de chromatographie

Les analyses CLHP sont réalisées sur un appareil Merck-Hitachi équipé d'un autosampler AS-2000A, de une pompe intelligent L-6200A et de un détecteur UV-vis L-4000 avec longueur d'onde réglable mise à 220 nm pour séparations analitiques et à

235nm pour séparations préparatives. Les colonnes pour les séparations analytiques sont des colonnes BU-300 aquapore Butyl 7m, 300 A 300x4.6 mm. de chez Perkin-Elmer et pour les séparations préparatives des colonnes Biosil C18 HL 90-10 250x10 mm de chez Biorad. Les phases mobiles sont H₂O (0.1 % TFA) et Acétonitrile (0.1% TFA). Le débit pour les analyses analytiques est réglé à 1 ml/min et pour les préparatives à 4 ml/min.

10 Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur des plaques de gel de silice Merck de 0,2 mm d' épaisseur.

15 Les chromatographies sur colonne ont été effectuées sur gel de silice 60 Merck de granulométrie 0,063-0,200 mm.
Elles sont révélées soit aux UV (254nm), à la ninhydrine, en vaporisant (spray léger) une solution éthanolique de ninhydrine (40 mg / 100 ml EtOH) pour révéler les amines ou les amides en chauffant à 150°C, à la fluorescamine, en vaporisant une solution (40 mg / 100 ml Acétone) pour révéler les amines primaires ou à l' iodé, en recouvrant la plaque de poudre d' iodé.

20 Les chromatographies sur colonne ont été effectuées sur gel de silice 60 Merck de granulométrie 0,063-0,200 mm.

d) **Technique de synthèse en phase solide SPPS**
La synthèse en phase solide est réalisée dans un réacteur manuel de synthèse de peptides SPPS de fabrication artisanal et l'agitateur est un Flask Shaker modèle A5-6021. L'évolution de couplage des polyamines à la phase solide ainsi que l'évolution de la protection des polyamines dans la SPPS est suivie par le test de Kaiser [Kaiser, E., Colescott, D.L., Bossinger, C.D. and Cook, P.I. *Anal. Biochem.* 34(2), 595 (1970)]. La résine utilisée dans les exemples pour la SPPS est la Chlorotriyl chloride Resin de chez NOVABIOCHEM-Suisse.

2- MODE OPERATOIRE GENERAL

a)-Synthèse de polyamines symétriques illustrée par la préparation de la (N,N'-N',N'-Tétraaminopropyl) 1-4-diamino butane:

5 Dans un ballon tricol de 2 litres, on charge 147 gr de 1-4-diamino Butane et 1000 ml d'eau déminéralisée. La solution est soumise à une agitation magnétique. Par l'intermédiaire d'une ampoule isobare on charge 443 gr d'acrylonitrile en 1 heure en conservant la température à 38 C°. On monte ensuite un condensateur pour reflux et
10 on porte la masse à 80 C° avec un bain-marie durant 1 heure. Le test fluorescamine s'avère négatif et l'excès d'acrylonitrile est évaporé in vacuo à 40 C°.
On obtient deux phases. La phase organique inférieure est séparée, lavée par 300 ml d'eau et transvasée dans un ballon de 1000 ml. On ajoute 170 ml d'un mélange eau/méthanol (1:1 v/v). On laisse cristalliser la nuit. Le lendemain, les cristaux sont
15 filtrés sur verre fritté de porosité 3 de 500 ml. L
Le gâteau est lavé sur le verre fritté avec du méthanol (2x170 ml.) et de l'éther (2x150 ml.). Le produit est séché en plateau au dessicteur sous vide (26 mm) pendant une nuit. On obtient ainsi 461 gr du produit (rendement 93%). Le produit a été analysé par RMN et MS et les analyses sont compatibles. Le produit est hydrogéné sans autre
20 purification.
Dans un autoclave inox de 1 litre on charge 30 gr du polynitrile précédent (0.1 mol). On prépare en même temps dans un becher une solution de 140 ml d'éthanol (95%) et de 8 gr de NaOH (0.2 mol). Lorsque la soude est solubilisée, on charge cette solution dans l'autoclave. De l'azote est passé dans l'autoclave et on charge 8 ml de Nickel de
25 Raney sur charbon. L'autoclave est fermé. La pression initiale d'hydrogénéation est de 52 at. et elle descend à 28.5 en 5 heures à température ambiante. La suspension est filtrée sur papier, le filtre est lavé avec de l'éthanol (2x25 ml), les filtrats sont concentrés à sec in vacuo. L'huile est mélangée avec 30 ml d'eau et extraite par 100 ml de CH₂Cl₂. La phase organique est séchée sous MgSO₄, filtrée puis évaporée in
30 vacuo. On obtient une huile fluide jaunâtre (27 gr rendement 85 %).
Le produit a été analysé par CCM (monotache), RMN et MS et les analyses étaient compatibles. Le produit est utilisé sans autre purification.

b)- Méthode A: Ancrage de une fonction acide sur le support polymérique:

De la résine Chlorotriyl chloride (5 gr. 1.2 mmol Cl/gr. resin) est chargée dans un réacteur SPPS, 50 ml de CH₂Cl₂ sont ajoutés et le mélange est agité pendant 5 mn. De 5 l'acide bromoacétique (1.05 gr, 7 mmol) est ajouté, suivi de DIEA (0.95 ml., 7.5 mmol). Le réacteur est agité pendant deux heures à température ambiante. Le liquide est filtré et la résine est lavée avec CH₂Cl₂ et iPrOH (10x50) et MeOH (2x50ml). Enfin, la résine est séchée sous un courant d'azote.

10

c)- Méthode B : Réaction des polyamines avec la bromoacetyl-resine:

La polyamine (10 excès molaires) est dissoute dans 50 ml CH₂Cl₂ et chargée dans le réacteur contenant le produit obtenu par la méthode A. Le réacteur est agité pendant 2 15 hr. à température ambiante. Le solvant est filtrée et la résine lavée avec CH₂Cl₂ et iPrOH (10x50 ml), le test de Kaiser est positif.

20

d)- Protection des polyamino acides sur la résine:**Méthode C :**

Les Di-tert-butyl dicarbonate (48 mmol) et DIEA (50 mmol) sont dissous dans CH₂Cl₂ (50 ml) et chargés dans le réacteur contenant le produit obtenu selon la méthode B. Le réacteur est agité pendant une nuit. Le lendemain le test de Kaiser est 25 négatif. Le solvant est filtré et la résine est lavée alternativement avec CH₂Cl₂ et iPrOH (10x50 ml), MeOH (2x50 ml) et éther (2x50 ml). La résine est séchée sous une courant d'azote. Le test de Kaiser est toujours négatif.

Méthode D :

30 La résine obtenue par le méthode B (1.5 gr) est chargée dans un ballon et CH₂Cl₂ (20 ml) est ajouté, suivi par DIEA (20 mmol). Le mélange est soumis à agitation magnétique et le chloroformate de benzyle (14 mmol) est ajouté goutte à goutte pendant 5 min. Le pH est maintenu à 11 par addition de DIEA. Après une nuit, la résine est passée dans un réacteur SPPS, filtrée et lavée alternativement avec CH₂Cl₂ 35 et iPrOH (10x20 ml) et éther (2x20 ml). La résine est séchée sous une courant d'azote.

e)- Méthode E : Clivage des acides polyaminées protégées de la résine:

Les résines obtenues par les méthodes C et D sont chargées dans un ballon de 250 ml
5 équipée d'un barreau magnétique. Une solution composée de 50 ml CH₂Cl₂ et 25 ml CF₃CH₂OH est ajoutée et le mélange est agité pendant 2 hr. La solution est filtrée, la résine est lavée avec CH₂Cl₂ (2x10 ml) et les phases organiques ainsi obtenues sont rassemblées et évaporées in vacuo. Les produits sont ensuite purifiés par flash chromatographie sur SiO₂ avec comme éluant CHCl₃/MeOH (9:1). Les fractions
10 contenant les produits sont identifiées par CCM. (Pour de plus amples détails voir les exemples ci-après.)

f)- Méthode F : Couplage des acides aminés avec dilipidylamines:

15 Boc-acide amine (10 mmol) et dilipidylamine C12-C22 (10 mmol) sont chargés dans un ballon de 250 ml. CHCl₃ (100 ml) est ajouté et le mélange est agité jusqu'à dissolution complète. TEA (30 mmol) et BOP (33 mmol) sont ensuite ajoutés. Le pH est maintenu à 10 avec TEA et la réaction est agitée pendant 2 hr. Après l'achèvement de la réaction (CCM) le chloroforme est évaporé et le solide est repris dans de l'acétate
20 d'éthyle (300 ml). La phase organique est lavée avec KHSO₄ (4x100 ml), NaHCO₃ (4x100 ml), et NaCl (4x100 ml). La phase organique est séchée sous MgSO₄ filtrée et évaporée in vacuo. Les produits sont analysés par CCM, NMR et MS et sont utilisés sans d'autres purifications. Les rendements sont de l'ordre de 90 %.

25 **g)- Couplage des acides polyamines protégés avec dilipidyl acides amides et clivage des groupements de protection Boc et Z**

Méthode G

Le produit obtenu par la méthode F (9 mmol) est chargé dans un ballon équipé d'un barreau magnétique et du TFA froid (4 °C) est ajouté (30 ml). La solution est agitée pendant 1 hr. Le TFA est évaporé in vacuo. Le produit est dissous par l'addition de DMF (70 ml). On ajoute du TEA (30 mmol) puis de l'acide polyamine protégé obtenu par la méthode E (9 mmol). Le pH est ajusté à 10 et BOP (33 mmol) est ajouté. La solution est agitée pendant 2 hr. et suivie par CCM. Après l'achèvement du couplage (CCM), une solution de KHSO₄ est ajoutée (700 ml) et le produit est extrait avec

· acétate d'éthyle (3x100 ml). La phase organique est lavée avec KHSO₄ (3x50), NaHCO₄ (3x50) et NaCl (3x50 ml), séchée sous MgSO₄, filtrée et évaporé in vacuo. Les produits sont analysés par RMN, CCM et MS et sont déprotégés sans purification préalable. Du TFA (50 ml) est ajouté au produit et la solution est agitée pendant 1.5 hr., le TFA est évaporé. Si le produit contient encore de groupements Z ou ClZ qui sont pas clivables au TFA la méthode H est suivie directement. Les produits finaux sont purifiés par CLHP semipréparative(voir exemples).

Méthode H

10 Les produits obtenus par le méthode G contenant des groupe Z ou ClZ sont chargés dans un ballon équipé d'un barreau magnétique et dissous dans 10 ml MeOH/gr produit. Les Pd/C (10 %, 1gr/Gr produit) et formiate d'ammonium(1 gr/gr produit) sont ajoutés à température ambiante. L'hydrogénéation est suivie par CLHP. Après 2 hr la réaction est finie, le mélange est filtré et le filtre lavé avec 10 ml MeOH. De l'eau double distillée est ajoutée et la solution est congelée et lyophilisée. Les produits finaux sont purifiés par CLHP préparative.

h) Méthode I de déprotection des groupements de protection Boc

15 L'acide trifluoro acétique (50 ml) est ajouté au produit contenant des groupements Boc (1 mmol) dans un ballon. La solution est agitée pendant 1.5 hr, le TFA est évaporé. L'amine est complètement deprotégée et prête à l'emploi pour des couplages sans autre purification.

25 **B-MATERIEL ET METHODE POUR L'ETUDE BIOLOGIQUE:**

1 PLASMIDES UTILISES POUR LE TRANSFERT DE GENES IN VITRO

Le plasmide pCMV-LUC est une construction dérivée, soit du plasmide pGL2-Basic Vector (Promega), soit du plasmide pGL2-Control Vector (Promega) par insertion d'un fragment Mlu I-Hind III contenant le promoteur du Cytomegalovirus humain (CMV) extrait du plasmide vecteur pcDNA3 (Invitrogen).

2 PROTOCOLE DE PREPARATION DES SOLUTIONS UTILISEES POUR LA TRANSFECTION

Les produits décrits dans l'invention sont mis en solution à 20 mM dans l'éthanol ou
5 dans l'eau ,puis dilués dans l'eau en s'assurant que la concentration éthanolique finale
est inférieure à 10%.

Les solutions d'acide nucléique diluées en serum physiologique (NaCl 0,15M) sont
ajoutées aux solutions de lipofectant dans un rapport 1/1 (v/v). Après homogénéisation
10 au vortex et incubation 15 minutes à température ambiante les solutions
ADN/lipofectant sont distribuées à 9% (v/v) final dans les puits où les cellules ont été
lavées par du milieu de croissance dépourvu de protéines (serum) et remises en
croissance en milieu dépourvu ou non de serum.

15 C MATERIEL POUR LES ESSAIS IN VIVO

1 MATERIELS

a) Modèles experimentaux:

20 - souris C57/BL 6 adultes (>8 semaines) femelles
- tumeurs de type 3LL (Lewis Lung carcinoma) obtenues par passage de fragments de
tumeur d'animal à animal, implantés sous la peau au niveau du flanc.

b) Plasmides utilisés:

25 pXL 2622: il dérive du pGL2 basic, (Promega) dans lequel le promoteur du
cytomegalovirus (CMV) extrait de pCDNA3 (Invitrogen) a été inséré en amont du
gène codant pour la luciférase. Ce plasmide est obtenu par la technique de
précipitation au PEG (Ausubel), et stocké dans du Tris 10mM EDTA 1mM pH 8 à 4
°C à une concentration d'environ 10 µg d'ADN par µl.

30

2 PROTOCOLES

Solutions injectées: L'ADN à transfacter est d'abord solubilisé dans le tampon, le
peptide (KTPKKAKKP)₂ SEQ ID N°1 est alors ajouté, et après 20 minutes une
35 solution de lipides cationiques à forte concentration (20 ou 40 mM) est ajoutée au

mélange. Après addition de tous les produits, le mélange contient, outre l'ADN (en concentration finale de 0,5mg/ml), le peptide (0,75mg/ml) et le lipide cationique, NaCl 150mM, D-Glucose 5% et MES 5mM pH 6,2. L'injection est réalisée 20 à 30 minutes après la préparation de la solution.

5

EXEMPLE 1:**Synthèse de H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COGlyN[(CH₂)₁₇CH₃]₂ (6)**

10 a- **Synthèse de l'acide {Boc-[3-(Boc-{4-[Boc-(3-Boc-amino-propyl)-amino]-butyl}amino) propyl]-amino}-acétique (3)**

La résine obtenue selon la méthode A est mise à réagir avec la spermine selon les méthodes B, C et E. Le produit protégé est purifié par chromatographie sur SiO₂. Le rendement est de 40 %.

CCM: R_f= 0,32 (CHCl₃/MeOH, 9:1)
CLHP, R_f= 4,22 min, (H₂O/MeCN: 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100])
Spectre de RMN ¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO d6 avec ajout de quelques gouttes de CD₃COOD d4, d en ppm) : 1,40 (s, 36H : C(CH₃)₃) ; 1,46 (mt, 4H : CH₂CH₂ centraux du butyle) ; 1,64 et 1,74 (2 mts, 2H chacun : CH₂ central des propyles) ; 2,96 (t, J = 7 Hz, 2H : CH₂NCOO) ; 3,15 (mt, 8H : CH₂NCH₂) ; 3,23 (t, J = 7,5 Hz, 2H : CH₂NCOO) ; 3,83 (s, 2H : OCONCH₂COO).
MH⁺: 661

25 b- **Synthèse de l'acide {Z-[3-(Z-{4-[Z-(3-Z-amino-propyl)-amino]-butyl}amino) propyl]-amino}-acétique (4)**

La résine obtenue selon la méthode A est mise à réagir avec de la spermine selon les méthodes B, C et D. Le produit protégé est purifié par chromatographie sur SiO₂. Le rendement est de l'ordre de 20 %.

CCM: R_f= 0,85 (CHCl₃/MeOH, 8:2)
CLHP, R_f= 6,92 min, (H₂O/MeCN: 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100])

Spectre de RMN ^1H (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ d6, à une température de 413K, d en ppm) : 1,49 (mt, 4H : CH_2CH_2 centraux du butyle) ; 1,74 et 1,81 (2 mts, 2H chacun : CH_2 central des propyles) ; 3,07 (q, $J = 7$ Hz, 2H : CH_2NCOO benzyle) ; de 3,15 à 3,30 (mt, 8H : CH_2NCH_2) ; 3,33 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H : NCH_2COO) ; 3,70 (s, 2H : OCON CH_2COO) ; 5,07 - 5,10 - 5,12 et 5,13 (4 s, 2H chacun : ArCH_2OCON) ; 6,65 (mf, 1H : NHCO) ; de 7,25 à 7,40 (mt, 20H : H aromatiques).

5 MH $^+$: 797

c- Boc-Gly-dioctadecylamide. (5)

10 Le Boc-Gly est couplé à la dioctadécylamine selon la méthode F, rendement de 90 %

CCM: $R_f = 0.9$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9:1)

MH $^+= 679$

Spectre de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , d en ppm) : 0,89 (t, $J = 7$ Hz, 6H : CH_3) ; 1,29 (mt, 60H : CH_2 centraux des chaînes grasses) ; 1,49 (s, 9H : $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 1,55 (mt, 4H : 1 CH_2 de chaque chaîne grasse) ; 3,15 et 3,33 (2 t, $J = 7,5$ Hz, 2H chacun : NCH_2 des chaînes grasses) ; 3,95 (d, $J = 5$ Hz, 2H : OCON CH_2CON) ; 5,57 (mf, 1H : CONH).

20 **d- $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlyN}[(\text{CH}_2)_18]_2$ (6)**

Les produits (3) et (5) ou (4) et (5) sont couplés selon la méthode G. Les produits sont déprotégés comme décrit dans la méthode G pour le produit protégé Boc et méthode H pour le produit protégé Z. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP.

25

CLHP, $R_f = 15.35$ min, ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$: 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]

BYK 2 053 Spectre de RMN ^1H (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ d6 avec ajout de quelques gouttes de CD_3COOD d4, à une température de 300K, d en ppm) : 0,83 (t, $J = 7$ Hz, 6H : CH_3) ; 1,23 (mt, 60H : CH_2 centraux des chaînes grasses) ; 1,43 et 1,53 (2 mts, 2H chacun : 1 CH_2 de chaque chaîne grasse) ; 1,63 (mt, 4H : CH_2CH_2 centraux du butyle) ; 1,96 (mt, 4H : CH_2 central des propyles) ; 2,93 - 3,00 et 3,22 (3 mts, 16H en totalité : NCH_2) ; 3,83 (s, 2H : NCH_2CON) ; 4,03 (s, 2H : CON CH_2CON).

MH $^+= 821$

35 **EXAMPLE 2:**

Synthèse de H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂CON[(CH₂)₁₈]₂ (7)

Le produit (3) est couplé avec la dioctadécylamine selon la méthode F et déprotégé selon la méthode G. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP.

CLHP, R_f= 15.2 min, (H₂O/MeCN: 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100])
Spectre de RMN ¹H (400 MHz, dans un mélange 2/3 de CF₃COOD et 1/3 de CD₃COOD d4, d en ppm) : 0,78 (t, J = 7 Hz, 6H : CH₃) ; 1,20 (mt, 60H : CH₂ centraux des chaînes grasses) ; 1,52 (mt, 4H : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse) ; 1,80 (mt, 4H : CH₂CH₂ centraux du butyle) ; 2,23 et 2,32 (2 mts, 2H chacun : CH₂ central des propyles) ; de 3,10 à 3,40 (3 mts, 16H en totalité : NCH₂) ; 4,15 (s, 2H : NCH₂CON).

MH⁺= 764

15

EXEMPLE 3:**Synthèse de H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COArgN[(CH₂)₁₈]₂** (9)

a- **Boc-Arg(Z₂)dioctadecylamide.** (8)
20 Le produit est synthétisé par couplage de BocArg(Z₂) et de dioctadécylamine par la méthode F avec un rendement de 91 %
CCM R_f= 0.9 (CHCl₃/MeOH, 9:1)
MH⁺= 1046

25 b- **H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COArgN[(CH₂)₁₈]₂** (9)
Le produit (3) ou (4) est couplé au produit (8) par la méthode G et déprotégé par la méthode G (Boc) et/ou H (Z). Le produit final est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP analytique.

CLHP, R_f= 13.83 min, (H₂O/MeCN: 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100])
30 Spectre de RMN ¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO d6, δ en ppm) : 0,90 (t, J = 7 Hz, 6H : CH₃) ; 1,28 (mt, 60H : CH₂ des chaînes grasses) ; de 1,40 à 1,80 (mt, 12H : CH₂) ; 1,93 (mt, 4H : CH₂ central des propyles) ; de 2,80 à 3,10 (mt, 16H : NCH₂ et NCH₂ des chaînes grasses) ; 3,42 (mt, 2H : CH₂N de l'amido) ; 3,77 (mt, 2H : NCH₂CON) ; 4,67 (mt, 1H : NCHCON) ; de 6,80 à 7,50 (mf étalé, 2H : NH₂) ; 7,78 - 7,92 - 8,80 et

9,03 (respectivement mt et 3mfs, respectivement 1H - 2H - 4H et 1H : CONH - NH et NH₂).

MH⁺: 920

5 EXEMPLE 4:

Synthèse de $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COArg(Z)}_2\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$ (10)

Le produit (3) est couplé au produit (8) par la méthode G et les groupes Boc clivés par la même méthode. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP analytique

CLHP, R_f = 17.75 min, (H₂O/MeCN: 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100])

Spectre de R M N ¹ H (400 MHz, (CD₃)₂SO, d en ppm) : 0,87 (t, J = 7 Hz, 6H :

15 CH₃) ; 1,25 (mt, 60H : CH₂ centraux des chaînes grasses) ; 1,40 et 1,57 (2 mts, 2H chacun : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse) ; 1,65 (mt, 8H : CH₂CH₂ centraux des butyles) ; 1,95 (mt, 4H : CH₂ central des propyles) ; de 2,85 à 3,05 (mt, 14H en totalité : NCH₂) ; 3,23 (t, J = 7,5 Hz, 2H : NCH₂) ; 3,75 (s, 2H : NCH₂CON) ; 3,85 et 3,95 (2 mts, 1H chacun : CH₂NC) ; 4,67 (mt, 1H : CONCHCON) ; 5,07 et 5,25 (respectivement AB limite et s, J = 13,5 Hz, 2H chacun : NCOOCH₂Ar) ; de 7,25 à 7,45 (mt, 10H : H aromatiques) ; 7,95 - 8,85 - 9,00 et 9,20 (4 mfs : H échangeables).

MH+·1188

EXAMPLE 5:

25 Synthèse de H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COLys(rhodamine)N[(CH₂)₁₇-CH₃]₂ (13)

a- Boc-Lys(Z)dioctadecylamide (11)

Le produit a été synthétisé par couplage de BocLys(ClZ) avec le dioctadécyllamine par la méthode F avec un rendement de 89 %.

CCM, Rf = .92 (CHCl₃/MeOH, 9:1)

MH⁺; 918

b-BocN(CH₂)₃NBoc(CH₂)₄NBoc(CH₂)₃NBocCH₂COLys(ClZ)N[(CH₂)₁₇-CH₃]₂ (12)

Le produit (3) est couplé au produit (11) par la méthode G (sans la déprotection du Boc).

Spectre de RMN ¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO d6, à une température de 423 K, d en ppm) : 0,92 (t, J = 6,5 Hz, 6H : CH₃) ; 1,32 (mt, 60H : CH₂ centraux des chaînes grasses) ; 1,44 (2 s, 36H en totalité : C (CH₃)₃) ; de 1,50 à 1,80 (mt, 16H : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse - CH₂CH₂ centraux du butyle - CH₂CH₂CH₂ et CH₂ central du propyle) ; 3,00 (q, J = 6,5 Hz, 2H : OCONCH₂) ; 3,05 (q, J = 6,5 Hz, 2H : CH₂NCOO) ; de 3,15 à 3,40 (mt, 14H : NCH₂ des chaînes grasses - CH₂NCH₂ et CH₂NCH₂CH₂N) ; 3,80 (s, 2H : OCONCH₂CON) ; 4,75 (mt, 1H : CONCHCON) ; 5,15 (s, 2H : NCOOCH₂Ar) ; 5,97 et 6,53 (2 mts, 1H chacun : OCONH et NHCOO) ; 7,08 (d, J = 7,5 Hz , 1H : CONH) ; de 7,30 à 7,50 (mts , 4H : H aromatiques).

c-H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COLys(rhodamine)N[(CH₂)₁₇-CH₃]₂ (13)

15 Le groupement ClZ sur la lysine du produit (12) est clivé par la méthode H, le produit ainsi obtenu est séché in vacuo et repris dans de l'éther et rincé avec NaHCO₃ et NaCl. L'éther est séché sur de MgSO₄ et évaporé in vacuo.
77 mg (60 µm) du produit déprotégé sont dissous dans 3 ml de MeOH, le DIEA (64 µL) est ajouté puis la tétramethyl rhodamine isothiocyanate (30 mg, 68 µm); la solution est agitée pendant 17 hr et la reaction est suivie par CCM. Le lendemain la solution est concentrée à sec in vacuo. Le TFA (4ml) est ensuite ajouté et on laisse agiter pendant 1 hr. Le TFA est évaporé et le produit brut est purifié par CCLHP semipréparative avec un rendement final de 30 %.
CCM, R_f= 0.05 (MeOH)
25 CLHP (semiprep.) R_f= 61,55 min. (H₂O/MeCN: 3 min [100/0], 3-45 min [0/100], 45-140 min. [0/100].
MH⁺:1335

EXEMPLE 6:

30 **Synthèse de H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COLys(biotinyl)N[(CH₂)₁₇-CH₃]₂ (14)**

35 Le produit (12) est déprotégé par la méthode H (271 mg, 0,21 mmol) et dissous dans du DMF (10 ml). le DIEA (0,11ml) est ajouté puis la biotine (56,4 mg, 0,23 mmol) et le BOP (102 mg, 0,23 mmol; le pH est maintenu à 10 (DIEA) et la fin de la réaction

est vérifiée par le test fluorescamine. Le produit est récupéré comme décrit dans la méthode F et déprotégé sans autre purification avec TFA (5 ml) pendant 1 hr. Le TFA est évaporé et le produit purifié par CLHP semipréparative avec un rendement de 50 %.

5 CLHP, $R_f = 13.12$ min, ($H_2O/MeCN$: 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100])
MH⁺: 1118

EXEMPLE 7

Synthèse de $\{H_2N(CH_2)_3\}_2N(CH_2)_4N\{(CH_2)_3NH_2\}(CH_2)_3NHCH_2COGlyN[(CH_2)_{17}-CH_3]_2$ (16)

a- $\{BocNH(CH_2)_3\}_2N(CH_2)_4N\{(CH_2)_3NHBoc\}(CH_2)_3NBocCH_2COOH$ (15)

Le produit (1) est ancré sur le polymère par la méthode B, protégé par la méthode C et clivé de la résine par la méthode E. Le produit est purifié sur SiO₂ avec un rendement de 35 %.

CCM: $R_f = 0,2$ ($CHCl_3/MeOH$, 8:2)

Spectre de RMN 1H (400 MHz, $(CD_3)_2SO$ d6 avec ajout de quelques gouttes de CD_3COOD d4, à une température de 433K, d en ppm) : 1,42 (s, 36H : C($CH_3)_3$) ; 1,56 (mt, 4H : CH_2CH_2 centraux du butyle) ; de 1,65 et 1,85 (mt, 8H : CH_2 central des propyles) ; 2,76 (mt, 12H : $CH_2N(CH_2)_2$) ; 3,06 (t, J = 6,5 Hz, 6H : OCONH₂) ; 3,29 (mt, 2H : NCH₂) ; 3,86 (s, 2H : OCONH₂COO).

MH⁺: 775

b- $\{H_2N(CH_2)_3\}_2N(CH_2)_4N\{(CH_2)_3NH_2\}(CH_2)_3NHCH_2COGlyN[(CH_2)_{17}-CH_3]_2$ (16)

Le produit (15) est couplé avec le produit (5) selon la méthode G. Le produit est déprotégé par méthode G et est purifié sur CLHP semipréparative, les fractions sont analysées par CLHP analytique et lyophilisées. Rendement de 55 %.

CLHP (semiprep.): $R_f = 38,72$ min ($H_2O/MeCN$, 10 min [100/0], 10-45 min [0/100], 45-140 min [0/100])

Spectre de RMN 1H (400 MHz, $(CD_3)_2SO$ d6, à une température de 386 K, d en ppm) : 0,90 (t, J = 7 Hz, 6H : CH_3) ; 1,30 (mt, 60H : CH_2 centraux des chaînes grasses) ; 1,55 (mt, 4H : 1 CH_2 de chaque chaîne grasse) ; 1,65 (mt, 4H : CH_2CH_2 centraux du butyle) ; 1,97 (mt, 8H : CH_2 central des propyles) ; de 2,80 à 3,05 - 3,06 et 3,28 (respectivement mt et 2 t, J = 7,5 Hz, 18H - 2H et 4H : NCH₂) ; 3,80 (s, 2H :

NCH₂CON) ; 4,03 (d, J = 5,5 Hz, 2H : CONCH₂CON) ; de 6,00 à 9,00 (mf étalé : NH₂ et NH) ; 8,27 (mt, 1H : CONH).

MH+: 935

5 EXEMPLE 8

Synthèse de:



Il est synthétisé comme le produit (7)en utilisant le produit (15) à la place du (3). Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP analytique et lyophilisées.

CLHP (semiprep.): $R_f = 38$ min ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$, 10 min[100/0], 10-45 min [0/100], 45-140 min [0/100])

Spectre de RMN ^1H (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ d6 avec ajout de quelques gouttes de CD_3COOD d4, d en ppm) : 0,88 (t , $J = 7$ Hz, 6H : CH_3) ; 1,29 (mt, 60H : CH_2 centraux des chaînes grasses) ; 1,52 (mt, 4H : 1 CH_2 de chaque chaîne grasse) ; 1,68 (mt, 4H : CH_2CH_2 centraux du butyle) ; de 1,90 à 2,10 (mt, 8H : CH_2 central des propyles) ; 2,90 - de 2,95 à 3,15 -3,18 et 3,15 (respectivement t - mt et 2 t larges, $J = 7,5$ Hz, 24H en totalité : NCH_2) ; 4,02 (s, 2H : NCH_2CON).

20 MH⁺ = 878

EXAMPLE 9

Synthèse de $\{H_2N(CH_2)_2\}_2N(CH_2)_2NHCH_2COGLyN[(CH_2)_{17}-CH_3]_2$, (19)

25 a- $\{BocNH(CH_2)_2\}_2N(CH_2)_2NBocCH_2COOH$ (18)

Il est synthétisé comme le produit (15) en utilisant la tris(aminoéthyl)amine à la place du produit (1). Rendement 29 %.

CCM, $R_f = 0.55$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 8:2)

Spectre de RMN ^1H (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ d6 à une température de 393 K, en ppm) : 1,44 (s, 27H : $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ; 2,58 (t, $J = 6,5$ Hz, 4H : CH_2NCH_2) ; 2,66 (t, $J = 7$ Hz, 2H : NCH_2) ; 3,04 (q, $J = 6,5$ Hz, 4H : OCONCH_2) ; 3,28 (t, $J = 7$ Hz, 2H : OCONCH_2) ; 3,76 (s, 2H : $\text{OCONCH}_2\text{COO}$) ; 6,06 (mf, 2H : CONH).

MH⁺ = 505

35 b- $\{H_2N(CH_2)_2\}_2N(CH_2)_2NHCH_2COGlyN[(CH_2)_{17}-CH_3]_2$ (19)

Il est synthétisé comme le produit (17) en utilisant (18) à la place de (15) avec un rendement de 65%.

CLHP, $R_f = 122$ min, ($H_2O/MeCN$, 10 min[100/0], 10-45 min [0/100], 45-140 min [0/100]

5 Spectre de RMN 1H (400 MHz, $(CD_3)_2SO$ d6 avec ajout de quelques gouttes de CD_3COOD d4, d en ppm) : 0,87 (t, $J = 7$ Hz, 6H : CH_3) ; de 1,15 à 1,35 (mt, 60H : CH_2 centraux des chaînes grasses) ; 1,45 et 1,55 (2 mts, 2H chacun : 1 CH_2 de chaque chaîne grasse) ; 2,64 (t, $J = 5,5$ Hz, 4H : CH_2NCH_2) ; 2,75 (t, $J = 6$ Hz, 2H : NCH_2) ; 2,95 (t, $J = 5,5$ Hz, 4H : NCH_2) ; 3,08 (t, $J = 6$ Hz, 2H : NCH_2) ; 3,25 (mt, 10 4H : NCH_2 des chaînes grasses) ; 3,88 (s, 2H : NCH_2CON) ; 4,06 (d, $J = 5$ Hz, 2H : $CONCH_2CON$) ; 7,75 (mf étalé résiduel : NH) ; 8,68 (t résiduel, $J = 5$ Hz : CONH).

$MH^+ \approx 765$

15 EXEMPLE 10

Synthèse de $\{H_2N(CH_2)_2\}_2N(CH_2)_2NHCH_2CON[(CH_2)_{17}CH_3]_2$ (20)

Il est synthétisé comme le produit (19) en utilisant le dioctadécylamine à la place de (5). Rendement de 73 %.

20 CLHP, $R_f = 100,1$ min, ($H_2O/MeCN$, 10 min[100/0], 10-45 min [0/100], 45-140 min [0/100]

$MH^+ = 708$

25 EXEMPLE 11

Synthèse de $NH_2(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHCH_2COLysN[(CH_2)_{17}CH_3]_2$ (21)
(RPR 127888 A)

30 Le produit (12) est déprotégé par la méthode H (Cl-Z), suivie de la méthode I. Le produit final est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP analytique.

CLHP, $R_f = 11,76$ min, ($H_2O/MeCN$: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]

$MH^+ = 892$

35 Spectre de RMN 1H (400 MHz, $(CD_3)_2SO$ d6, à une température de 393K, d en ppm) : 0,91 (t, $J = 7$ Hz, 6H : CH_3 des chaînes grasses) ; 1,31 (mt, 60H : $(CH_2)_{15}$

centraux des chaînes grasses) ; de 1,35 à 1,75 (mt, 10H : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse, (CH₂)₃ centraux du lysyle) ; 1,75 (mt, 4H : (CH₂)₂ centraux du butyle) ; 2,00 (mt, 4H : CH₂ des propyles) ; 2,82 - 2,98 - 3,06 et de 3,10 à 3,50 (respectivement 2 t - mt et 2mfs, J = 7 Hz, 18H en totalité : NCH₂ du lysyle - NCH₂ du butyle - NCH₂ des propyles et NCH₂ des chaînes grasses) ; 3,62 (s, 2H : NCH₂CON) ; 4,73 (q, J = 7 Hz, 1H : CONCHCON du lysyle) ; 8,18 (d, J = 7 Hz, 1H : CONH du lysyle).

EXEMPLE 12

10 **Synthèse de NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COLys(Cl-Z)N[(CH₂)₁₇CH₃]₂ (22) (RPR 122759 A)**

Le produit (12) est déprotégé par la méthode I. Le produit final est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP analytique.

15 **CLHP, Rt= 16.79 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100] MH⁺:1060**

Spectre de RMN ¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO d6, à une température de 373K, d en ppm) : 0,91 (t, J = 7 Hz, 6H : CH₃ des chaînes grasses) ; 1,31 (mt, 60H : (CH₂)₁₅ centraux des chaînes grasses) ; de 1,30 à 1,75 (mt, 10H : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse, (CH₂)₃ centraux du lysyle) ; 1,72 (mt, 4H : (CH₂)₂ centraux du butyle) ; 1,95 (mt, 4H : CH₂ des propyles) ; 2,98 - 3,06 et de 2,90 à 3,50 (respectivement 2 mts et mf, 18H en totalité : NCH₂ du lysyle - NCH₂ du butyle - NCH₂ des propyles et NCH₂ des chaînes grasses) ; 3,59 (s, 2H : NCH₂CON) ; 4,75 (q, J = 7 Hz, 1H : CONCHCON du lysyle) ; 5,16 (s, 2H : COOCH₂Ar) ; 6,85 (mf, 1H : OCONH) ; de 7,35 à 7,55 (mt, 5H : H Aromatiques) ; 8,15 (mf, 1H : CONH du lysyle).

EXEMPLE 13

Synthèse de

30 **NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COLys(CHO)N[(CH₂)₁₇CH₃]₂ (24) (RPR 122760 A) (24).**

a- NBoc(CH₂)₃NBoc(CH₂)₄NBoc(CH₂)₃NBocCH₂COLysN[(CH₂)₁₇CH₃]₂ (23)

Le produit (12) est déprotégé par la méthode H (Cl-Z) avec rendement de 65% et 35 utilisé sans autre purification.

CLHP, Rt= 20.82 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]

b- NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COLys(CHO)N[(CH₂)₁₇CH₃]₂ (24)

Le produit (23) est couplé avec l'acide formique par la méthode G. Le produit est
5 purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP analytique.

CLHP, Rt=13.60 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]

MH⁺: 920

Spectre de RMN ¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO d6, à une température de 383K, d en
ppm) : 0,92 (t, J = 7 Hz, 6H : CH₃ des chaînes grasses) ; 1,31 (mt, 60H : (CH₂)₁₅
10 centraux des chaînes grasses) ; de 1,35 à 1,70 (mt, 10H : 1 CH₂ de chaque chaîne
grasse, (CH₂)₃ centraux du lysyle) ; 1,73 (mt, 4H : (CH₂)₂ centraux du butyle) ; 1,98
(mt, 4H : CH₂ des propyles) ; de 2,85 à 3,50 (mt, 18H : NCH₂ du lysyle - NCH₂ du
butyle - NCH₂ des propyles et NCH₂ des chaînes grasses) ; 3,62 (s, 2H : NCH₂CON) ;
4,75 (mt, 1H : CONCHCON du lysyle) ; 7,60 (mf, 1H : CONH) ; 8,05 (s large, 1H :
15 CH de l'aldéhyde) ; 8,18 (mf, 1H : CONH du lysyle).

EXEMPLE 14

20 Synthèse de

NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COLys[Cholesteryl]N[(CH₂)₁₇CH₃]₂ (25)

(RPR 128142 A)

Le produit (23) est couplé avec du cholestéryl chloroformate selon la méthode G
25 (sans utilisation du réactif BOP). Le produit est purifié par CLHP semipréparative et
les fractions analysées par CLHP analytique.

CLHP, Rt=21.66 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]

MH⁺: 1304

30 Spectre de RMN ¹H (600 MHz, (CD₃)₂SO d6, d en ppm) : 0,68 et 0,98 (2 s, 3H
chacun : CH₃ en 18 et CH₃ en 19 du cholestéryle) ; 0,86 (mt, 12H : CH₃ des chaînes
grasses et CH₃ en 26 et 27 du cholestéryle) ; 0,91 (d, J = 7 Hz, 3H : CH₃ en 21 du
cholestéryle) ; 1,31 (mt, 60H : (CH₂)₁₅ centraux des chaînes grasses) ; de 0,80 à 2,30
(mt, 42H : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse - CH₂ en 1, 2, 4, 7, 11, 12, 15, 16, 22, 23
35 et 24 du cholestéryle - CH en 8, 9, 14, 17, 20 et 25 du cholestéryle - (CH₂)₃ centraux

- du lysyle et CH₂ des propyles) ; 1.65 (mt, 4H : (CH₂)₂ centraux du butyle) ; 2,88 et 2,96 (2 mts, 14H en totalité : NCH₂ du lysyle - NCH₂ du butyle - NCH₂ des propyles) ; de 3,20 à 3,50 (mt, 4H : NCH₂ des chaînes grasses) ; 3,64 (s, 2H : NCH₂CON) ; 4,23 (mt, 1H : CH en 3 du cholestéryle) ; 4,63 (mt, 1H : CONCHCON du lysyle) ; 5 5,30 (mt, 1H : CH en 6 du cholestéryle) ; 6,98 (mt, 1H : NHCOO) ; 7,90 (mt, 1H : CONH du lysyle) ; 8,60 à 9,10 (mfs échangeables).

10 **EXEMPLE 15**

Synthèse de

NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COlys[Arachidonyl]N[(CH₂)₁₇CH₃]₂ (26)
(RPR 130605)

15 Le produit (23) est couplé avec de l'acide arachidonique sous courant d'azote et à l'abris de la lumière selon la méthode G. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP analytique.

CLHP, Rt=20.67 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]

MH⁺: 1177

20 Spectre de RMN ¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO d6 avec ajout de quelques gouttes de CD₃COOD d4, à une température de 393K, d en ppm) : 0,90 (t, J = 7 Hz, 6H : CH₃ des chaînes grasses) ; 0,91 (t, J = 7 Hz, 3H : CH₃ de l'arachidonyle) ; 1,31 (mt, 60H : (CH₂)₁₅ centraux des chaînes grasses) ; de 1,35 à 1,75 (mt, 18H : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse - (CH₂)₃ centraux et CH₂ central de l'arachidonyle et (CH₂)₃ centraux du lysyle) ; 1,75 (mt, 4H : (CH₂)₂ centraux du butyle) ; 2,02 (mt, 4H : CH₂ des propyles) ; 2,10 (mt, 6H : COCH₂ et les deux =CCH₂ de l'arachidonyle) ; 2,80 - 2,97- 3,06 et de 3,10 à 3,50 (respectivement mt - t - mt et 2 mfs, J = 7 Hz, 24H en totalité : =CCH₂C= de l'arachidonyle - NCH₂ du lysyle - NCH₂ du butyle - NCH₂ des propyles et NCH₂ des chaînes grasses) ; 3,62 (s, 2H : NCH₂CON) ; 4,73 (dd, J = 8 et 5 Hz, 1H : CONCHCON du lysyle) ; 5,38 (mt, 8H : CH=CH de l'arachidonyle).

EXEMPLE 16

Synthèse de NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COGluN[(CH₂)₁₇CH₃]₂ (28)
(RPR 126097 A)

a- Boc-Glu(O-Bz)-dioctadécyamine (27)

Le produit est synthétisé par couplage de Boc- GLU(OBz) et de dioctadécyamine par la méthode F avec un rendement de 90 %

5 **CCM** R_f= 0.88 (CHCl₃/MeOH, 9:1)

b- NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COGluN[(CH₂)₁₇CH₃]₂ (28)

Le produit (3) ou (4) est couplé au produit (27) par la méthode G, suivie de la méthode H (déprotection Cl-Z). Le produit final est purifié par CLHP semipréparative 10 et les fractions analysées par CLHP analytique.

CLHP, R_t= 14.64 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]

MH⁺: 893

Spectre de R M N ¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO d6, à une température de 383K, d en ppm) : 0,90 (t, J = 7 Hz, 6H : CH₃ des chaînes grasses) ; 1,30 (mt, 60H : (CH₂)₁₅ 15 centraux des chaînes grasses) ; 1,56 (mf, 4H : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse) ; de 1,60 à 2,00 (mt, 2H : CH₂ central du glutaryle) ; 1.73 (mt, 4H : (CH₂)₂ centraux du butyle) ; 1,98 (mt, 4H : CH₂ des propyles) ; 2,32 (t, J = 7 Hz, 2H : COCH₂ du glutaryle) ; 3,00 - 3,06 et 3,45 (respectivement t et 2 mts, J = 7 Hz, 16H en totalité : 20 NCH₂ du butyle - NCH₂des propyles et NCH₂ des chaînes grasses) ; 3,65 (s large, 2H : NCH₂CON) ; 4,85 (mt, 1H : CONCHCON du glutaryle) ; 8,19 (s large, 1H : CONH du glutaryle).

EXAMPLE 17

25 **Synthèse de**

NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COGlu(O-Bz)N[(CH₂)₁₇CH₃]₂ (29)

(RPR 123027 A)

Le produit (3) est couplé au produit (27) et déprotégé par la méthode G (Boc). Le 30 produit final est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP analytique.

CLHP, R_t= 16.02 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]

MH⁺: 983

Spectre de R M N ^1H (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ d6, à une température de 413K, d en ppm) : 0,89 (t, J = 7 Hz, 6H : CH_3 des chaînes grasses) ; 1,30 (mt, 60H : $(\text{CH}_2)_{15}$ centraux des chaînes grasses) ; 1,55 (mf, 4H : 1 CH_2 de chaque chaîne grasse) ; 1,72 (mt, 4H : $(\text{CH}_2)_2$ centraux du butyle) ; de 1,75 à 2,00 (mt, 2H : CH_2 central du glutaryle) ; 1,99 (mt, 4H : CH_2 des propyles) ; 2,47 (t, J = 7 Hz, 2H : COCH_2 du glutaryle) ; 2,95 - 3,05 et 3,40 (3 mts, 16H en totalité : NCH_2 du butyle - NCH_2 des propyles et NCH_2 des chaînes grasses) ; 3,62 (s large, 2H : NCH_2CON) ; 4,85 (mt, 1H : CONCHCON du glutaryle) ; 5,14 (AB limite, J = 12 Hz, 2H : CH_2 du benzyle) ; 7,35 (mt, 5H : H Aromatiques du benzyle) ; 8,23 (mf, 1H : CONH du glutaryle).

10

EXEMPLE 18**Synthèse de**

15 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu(Galactosamide)N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$,
(31) (RPR 130596 A)

a- $\text{BocNH}(\text{CH}_2)_3\text{NBoc}(\text{CH}_2)_4\text{NBoc}(\text{CH}_2)_3\text{NBocCH}_2\text{COGluN}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$ (30)

Le produit (3) est couplé au produit (27) et le groupe de protection OBz de la chaîne latérale est clivé par la méthode H (Cl-Z) et utilisé sans autre purification.

20 CLHP, Rt= 22.84 min, ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]
MH⁺: 1293

b- $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu(Galactosamide)N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
(31)

25 Le produit (30) est couplé avec du D(+)-Galactosamine chlorhydrate selon la méthode G. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP analytique.

CLHP, Rt=13.71 min, ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]
MH⁺: 1054

30

EXEMPLE 19**Synthèse de**

35 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu(Galactosamide)N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$,
(32) (RPR 130595 A)

Le produit (30) est couplé avec du D(+) -Glucosamine chlorhydrate selon la méthode G. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP analytique.

5 CLHP, Rt=12.27 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]
MH⁺: 1054

EXEMPLE 20

10 **Synthèse de**
NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COGlu(Mannosamide)N[(CH₂)₁₇CH₃]₂
(33) (RPR 130598 A)

15 Le produit (30) est couplé avec du D(+) Mannosamine chlorhydrate selon la méthode G. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP analytique.
CLHP, Rt=12.98 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]
MH⁺: 1054

20 **EXEMPLE 21**
Synthèse de

NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COGlu(N(CH₃)₂)N[(CH₂)₁₇CH₃]₂ (34)
(RPR 131111 A)

25 Le produit (30) est couplé avec de la Diméthylamine selon la méthode G. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP analytique.
CLHP, Rt=14.44 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]
MH⁺: 920

30 Spectre de RMN ¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO d6, d en ppm) : 0,89 (t, J = 7 Hz, 6H : CH₃ des chaînes grasses) ; 1,25 (mt, 60H : (CH₂)₁₅ centraux des chaînes grasses) ; 1,43 et 1,60 (2 mts, 2H chacun : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse) ; 1,65 (mt, 4H : (CH₂)₂ centraux du butyle) ; 1,65 et de 1,85 à 2,00 (2 mts, 1H chacun : CH₂ central du glutaryle) ; 1,95 (mt, 4H : CH₂ des propyles) ; 2,32 (AB limite, 2H : COCH₂ du glutaryle) ; 2,80 et 2,92 (2s, 3H chacun : CON(CH₃)₂) ; de 2,85 à 3,05 (mt, 12H : 35

NCH₂ du butyle - NCH₂ des propyles) ; 3,00 - 3,22 - 3,45 et 3,58 (4 mts, 1H chacun : NCH₂ des chaînes grasses) ; 3,78 (AB, J = 16 Hz, 2H : NCH₂CON) ; 4,75 (mt, 1H : CONCHCON du glutaryle) ; 8,72 (d, J = 7,5 Hz, 1H : CONH du glutaryle) ; 8,85 et de 8,90 à 9,15 (mfs échangeables).

5

EXEMPLE 22

Synthèse de NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COGlyN[(CH₂)₁₁CH₃]₂ (35) (RPR 122767 A)

10

Synthétisé de la même manière que le produit (6), mais en utilisant de la didodecylamine à la place de dioctadecylamine. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP.

CLHP, Rt=9.54 min,(H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]

15

MH⁺: 653

Spectre de R M N ¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO d6, à une température de 403K, d en ppm) : 0,93 (t, J = 7 Hz, 6H : CH₃ des chaînes grasses) ; 1,33 (mt, 36H : (CH₂)₉ centraux des chaînes grasses) ; 1,58 (mt, 4H : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse) ; 1,75 (mt, 4H : (CH₂)₂ centraux du butyle) ; 1,95 et 2,00 (2 mts, 2H chacun : CH₂ central des propyles) ; 2,98 et 3,00 (2 mts, 12H en totalité : NCH₂ du butyle et NCH₂ des propyles) ; 3,30 (t, J = 7Hz, 4H : NCH₂ des chaînes grasses) ; 3,58 (s, 2H : NCH₂CON) ; 4,05 (s, 2H : CONCH₂CON du glycyle).

25

EXEMPLE 23

Synthèse de NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COGlyN[(CH₂)₁₂CH₃]₂ (36) (RPR 122774 A)

30

Synthétisé de la même manière que le produit (6), mais en utilisant de la ditridecylamine à la place de dioctadecylamine. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP.

CLHP, Rt=10.64 min,(H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]

35

MH⁺: 681

Spectre de R M N ¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO d6, à une température de 393K, d en ppm) : 0,91 (t, J = 7 Hz, 6H : CH₃ des chaînes grasses) ; 1,33 (mt, 40H : (CH₂)₁₀

centraux des chaînes grasses) ; 1,58 (mts, 4H : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse) ; 1,75 (mt, 4H : (CH₂)₂ centraux du butyle) ; 2,00 (mt, 4H : CH₂ central des propyles) ; 2,98 et 3,08 (2 t, J = 7 Hz, 12H en totalité : NCH₂ du butyle et NCH₂ des propyles) ; 3,32 (t, J = 7 Hz, 4H : NCH₂ des chaînes grasses) ; 3,65 (s, 2H : NCH₂CON) ; 4,06 (d, J = 5 Hz, 2H : CONCH₂CON du glycyle) ; 8,60 (s large, 1H : CONH du glycyle).

EXEMPLE 24

Synthèse de NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COGlyN[(CH₂)₁₁CH₃]₂ (37)
10 (RPR 122766 A)

Synthétisé de la même manière que le produit (6), mais en utilisant de la ditetradecylamine à la place de dioctadecylamine. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP. Le produit est purifié par CLHP 15 semipréparative et les fractions analysées par CLHP.

CLHP, Rt=9.92 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]
MH⁺: 709
Spectre de R M N ¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO d6, à une température de 393K, d en ppm) : 0,90 (t, J = 7 Hz, 6H : CH₃ des chaînes grasses) ; 1,31 (mt, 44H : (CH₂)₁₁ 20 centraux des chaînes grasses) ; 1,58 (mt, 4H : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse) ; 1,76 (mt, 4H : (CH₂)₂ centraux du butyle) ; 2,00 (mt, 4H : CH₂ central des propyles) ; 2,98 et 3,08 (respectivement mt et t, J = 7 Hz, 12H en totalité : NCH₂ du butyle et NCH₂ des propyles) ; 3,30 (t, J = 7 Hz, 4H : NCH₂ des chaînes grasses) ; 3,65 (s, 2H : NCH₂CON) ; 4,06 (d, J = 4 Hz, 2H : CONCH₂CON du glycyle) ; 8,10 (mf, 1H : 25 CONH du glycyle).

EXEMPLE 25

Synthèse NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄N[(CH₂)₃NH₂]CH₂COGlyN[(CH₂)₁₇CH₃]₂ (39)
30 (RPR 126096 A)

a- Synthèse de BocNH(CH₂)₃NBoc(CH₂)₄N[(CH₂)₃NHBoc]CH₂CO₂H (38)
Pendant la synthèse du produit (3), on récupère lors de la purification sur SiO₂ le sous produit (38). Le rendement est de 8 %.
35 CCM Rf= 0.32 (CHCl₃/MeOH, 9:1)

MH⁺: 561

Spectre de RMN ¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO d6, d en ppm) : de 1.30 à 1.60 (mt, 4H : (CH₂)₂ centraux du butyle) ; 1,40 (s, 27H : C(CH₃)₃) ; 1,56 (mt, 4H : CH₂ des propyles) ; 2,68 et 3,11 (respectivement t large et t, J = 7 Hz, 4H chacun : NCH₂ du butyle et NCH₂ des propyles) ; 2,90 et 2,96 (2 q, J = 7 Hz, 2H chacun : BocNHCH₂ des propyles) ; 3,18 (s, 2H : NCH₂COO).

b-NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄N[(CH₂)₃NH₂]CH₂COGlyN[(CH₂)₁₇CH₃]₂ (39)

Les produits (38) et (5) sont couplés selon la méthode G. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP.

CLHP, R_t=13.60 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]

MH⁺: 821

Spectre de RMN ¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO d6 avec ajout de quelques gouttes de CD₃COOD d4, d en ppm) : 0,87 (t, J = 7 Hz, 6H : CH₃ des chaînes grasses) ; 1,28 (mt, 60H : (CH₂)₁₅ centraux des chaînes grasses) ; 1,46 et 1,54 (2 mts, 2H chacun : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse) ; 1,63 (mt, 4H : (CH₂)₂ centraux du butyle) ; 1,91 (mt, 4H : CH₂ des propyles) ; de 2,85 à 3,15 (mt, 12H : NCH₂ du butyle et NCH₂ des propyles) ; 3,24 (mt, 4H : NCH₂ des chaînes grasses) ; 3,76 (mf, 2H : NCH₂CON) ; 4,05 (s large, 2H : CONCH₂CON du glycyle).

20

EXAMPLE 26

Synthèse de

NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NH(CH₂)₃CON[(CH₂)₁₇CH₃]₂ (41)

25 **(RPR 122786 A)**

a-BocNH(CH₂)₃NBoc(CH₂)₄NBoc(CH₂)₃NBoc(CH₂)₃CO₂H (40)

On synthétise le produit (40) en faisant une réduction alkylative sur la spermine en présence de NaCNBH₃ et de succinic semialdehyde en solution.

30 Dans un ballon de 200 ml, on charge 1.8 gr de spermine, 60 ml de méthanol et 0.138 gr de NaCNBH₃. La solution est soumise à une vive agitation magnétique. Par l'intermédiaire d'une ampoule isobare on coule en 100 minutes une solution de 5.5 ml de succinic semialdehyde (15 %) avec 30 ml de méthanol. On maintient l'agitation 100 minutes. On protège les amines par le groupe Boc de la manière suivante: on coule sur le milieu 2.8 ml de TEA puis 8.8 gr de Ditiertiobutyl dicarbonate solubilisé dans 30 ml

de Méthanol. On maintient la nuit sous agitation. Le milieu est concentré in vacuo, le produit est repris dans l'acétate d'éthyle et extrait avec trois fractions de 50 ml NaHCO₃, les phases aqueuses sont réunies et rincées avec éther (3x100 ml). Le pH de la phase aqueuse est descendu à 3 avec KHSO₄, on apprécie une turbidité due à la 5 précipitation du produit 41, le mélange est extrait avec acétate d'éthyle (3x100ml). La phase organique est séchée sur MgSO₄ et évaporée in vacuo. Le produit est utilisé sans autre purification.



10 Le produit (40) et la dioctadécyamine sont couplés selon la méthode G. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP.

CLHP, Rt=15.04 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]

MH⁺: 792

15 Spectre de RMN ¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO d6, à une température de 383K, d en ppm) : 0,85 (t, J = 7 Hz, 6H : CH₃ des chaînes grasses) ; 1,22 (mt, 60H : (CH₂)₁₅ centraux des chaînes grasses) ; 1,48 (mf, 4H : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse) ; 1,72 (mt, 4H : (CH₂)₂ centraux du butyle) ; 1,88 (mt, 2H : CH₂ central de l'aminopentanoyle) ; 1,99 (mt, 4H : CH₂ des propyles) ; 2,42 (t, J = 7 Hz, 2H : COCH₂ de l'aminopentanoyle) ; 2,96 - 3,03 et 3,22 (3 mts, 18H en totalité : NCH₂ de 20 l'aminopentanoyle - NCH₂ du butyle - NCH₂ des propyles et NCH₂ des chaînes grasses).

EXEMPLE 27

25 Synthèse de



(RPR 128506 A)

30 Synthétisé de la même manière que le produit (6), mais en utilisant Boc 6-aminocaproïc acide à la place de BocGly. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP.

CLHP, Rt=13.94 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]

MH⁺: 877

35 Spectre de RMN ¹H (300 MHz, (CD₃)₂SO d6, d en ppm) : 0,87 (t, J = 7 Hz, 6H : CH₃ des chaînes grasses) ; 1,28 (mt, 60H : (CH₂)₁₅ centraux des chaînes grasses) ;

1,48 (mt, 10H : 1 CH₂ de chaque chaîne grasse et (CH₂)₃ centraux de l'aminohexanoyle) ; 1,65 (mt, 4H : (CH₂)₂ centraux du butyle) ; 1,95 (mt, 4H : CH₂ des propyles) ; 2,27 (t, J = 7 Hz, 2H : COCH₂ de l'aminohexanoyle) ; de 2,85 à 3,30 (mts, 18H : NCH₂ de l'aminohexanoyle - NCH₂ du butyle - NCH₂ des propyles et 5 NCH₂ des chaînes grasses) ; 3,70 (s large, 2H : NCH₂CON) ; de 7,90 à 9,10 (mfs échangeables).

EXEMPLE 28

10 **Synthèse de**



acétyl lactose) N[(CH₂)₁₇CH₃]₂

(43)

(RPR 130765 A)

15 Le produit (30) est couplé avec de le 11 aminoundécanyl hepta O acétyl lactose selon la méthode G. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP analytique.

CLHP, Rt=15.91 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]

MH⁺: 1680

20

EXEMPLE 29

Synthèse de



25 (RPR 131283 A) (45)

a- Fmoc-Asm-β-Glc-NAc(Ac)₃-dioctadécyamine (44)

Le produit est synthétisé par couplage de Fmoc-Asm-β-Glc-NAc(Ac)₃-OH et de dioctadécyamine par la méthode F

30 CCM Rf= 0.67 (CHCl₃/MeOH, 9:1)

CLHP, Rt=25.31 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]

35

b-NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂CO Asm (β-NAc(Ac)₃)N[(CH₂)₁₇CH₃]₂
(45)

Clivage du groupement Fmoc du produit (45).

On coule sur 0.7 gr de produit (45) 20 ml de DMF et 2 ml de Diéthylamine. Après 6
5 heures de maintient sous agitation le milieu est concentré in vacuo

Le produit obtenu est couplé au produit (3) selon la méthode G. Le produit est purifié par CLHP semipréparative et les fractions analysées par CLHP analytique.

CLHP, Rt=15.35 min, (H₂O/MeCN: 3 min [60/40], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]

MH⁺: 1207

10

EXAMPLE 30

Synthèse en solution du produit (6) à grande échelle.

15

On synthétise le produit (6) en faisant une réduction alkylative sur la spermine en présence de NaCNBH₃ et de l'acide glioxylique en solution.

Dans un ballon de 2 l, on charge 18.2 gr de spermine, 500 ml de méthanol et 2 gr de NaCNBH₃. La solution est soumise à une vive agitation magnétique. Par 20 l'intermédiaire d'une ampoule isobare on coule en 100 minutes une solution de 8.45 gr. d'acide glioxylic dans 300 ml de méthanol. On maintient l'agitation pendant une nuit. On protège les amines par le groupe Boc de la manière suivante: on coule sur le milieu 14 ml de TEA puis 100 gr de Ditertiobutyl dicarbonate solubilisé dans 200 ml THF. On maintient la nuit sous agitation. Le milieu est concentré in vacuo, le produit est repris dans acétate d'éthyle (250 ml), rincé avec KHSO₄ (6x100 ml) puis avec une solution saturée de NaCl (3x100), séché sur MgSO₄ et évaporée in vacuo. Le produit est purifié sur colonne de silice avec pour eluant CHCl₃/MeOH (9:1). Les fractions contenant le produit sont identifiées par CCM, regroupées et évaporées in vacuo pour obtenir 10 gr. du produit (6) (rendement de 17 % pour la synthèse total).

30 Les analyses de CLHP analytique, spectre de masse et RMN sont identiques à celles du produit obtenue par la méthode de phase solide.

EXAMPLE 31

Influence du rapport de charge (amines/phosphates) sur l'efficacité de transfection (7)
RPR 120534A, (6) RPR 120535A et (9) RPR 120531A

Des échantillons de 1.10^5 cellules [NIH 3T3, 3LL ou SMClapin] en phase exponentielle de croissance sur 2 cm^2 sont traités par des solutions lipofectant/pCMV-LUC, présentant des rapports de charges variables, pendant 2 heures à 37°C sous 5% CO_2 ; chaque échantillon reçoit 2 μg d'acide nucléique. La recherche de l'expression du gène reporter est effectuée après addition de sérum de veau foetal à 8% final suivie d'une incubation de 40 heures dans l'étuve à CO_2 .

L'activité luciférase est dosée par l'émission de lumière [RLU = relative light unit] en présence de luciférine, coenzyme A et ATP pendant 10 secondes et rapportée à 2000 cellules traitées. Les résultats obtenus sont reportés dans les figures (1), (2) et (3).

De l'observation de ces figures, il ressort clairement que la présence d'une glycine dans le bras « spacer » entre la partie lipidique et la polyamine permet d'obtenir une meilleure efficacité de transfection pour des ratio nanomoles lipide cationique/ μg ADN faibles.

20 **EXAMPLE 32**

Influence du rapport de charge (amines/phosphates) sur l'efficacité de transfection (20)
RPR 120527A, (19) RPR 120528A, (17)RPR 120526A et (16) RPR 120525A

Des échantillons de 1.10^5 cellules NIH 3T3 en phase exponentielle de croissance sur 2 cm^2 sont traités par des solutions lipofectant/pCMV-LUC, présentant des rapports de charges variables, pendant 2 heures à 37°C sous 5% CO_2 ; chaque échantillon reçoit 1 μg d'acide nucléique. La recherche de l'expression du gène reporter est effectuée après addition de sérum de veau foetal à 8% final suivie d'une incubation de 40 heures dans l'étuve à CO_2 .

L'activité luciférase est dosée dans le surnageant obtenu après lyse des cellules par l'émission de lumière [RLU = relative light unit] pendant 10 secondes et rapportée au mg de protéine. Les résultats obtenus sont reportés dans la figure (4). L'avantage de la présence du résidu glycine dans le bras « spacer » est encore mis en évidence dans cet exemple.

EXEMPLE 33

Influence de la longueur du spacer sur l'efficacité de transfection (6)
RPR 120535, (41) RPR 122786 et (42) RPR 128506.

5

Des échantillons de 1.10^5 cellules [NIH3T3 et HeLa] en phase exponentielle de croissance sur 2 cm^2 sont traitées par des mélanges lipide cationique/pCMV-Luc, présentant des concentrations variables en lipide cationique, à 37°C en atmosphère
10 humide sous 5% CO_2 , pendant 2 heures en absence de protéines sériques. Le milieu de croissance des cellules est ensuite supplémenté par du sérum de veau foetal à 8% final et la mesure de l'expression du transgène est effectuée après 40 heures supplémentaires d'incubation dans l'étuve à CO_2 .

15 Les caractéristiques structurales des spacers sont comme suit:

N° RPR	Spacer
122786	-
120535	Gly
128506	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CO}$

20 Le tableau I suivant reportent les résultats obtenus qui sont exprimés pour les efficacités maximum obtenues avec chacun des produits étudiés.

	lipide cationique	cellules HeLa		cellules NIH3T3	
expérience 1	RPR120535 (6)	$1,2.10^6 \pm 9,7.10^4$	(4)	$8,7.10^7 \pm 4,5.10^6$	(4)
	RPR122786 (41)	$2,3.10^6 \pm 1,6.10^5$	(8)	$4,6.10^7 \pm 5,0.10^6$	(8)
expérience 2	RPR120535 (6)	$2,4.10^6 \pm 3,2.10^5$	(6)	$7,2.10^7 \pm 8,3.10^6$	(6)
	RPR128506 (42)	$1,8.10^6 \pm 1,3.10^5$	(6)	$5,0.10^7 \pm 1,5.10^6$	(6)

TABLEAU I

25

- Les efficacités de transfection sont données en RLU/10s./2.103 cellules traitées. Entre parenthèses sont indiqués les ratio nanomoles lipid/ μ g ADN.

Des plasmides différents ont été utilisés pour les expériences 1 et 2, à dose de 1 μ g et 5 0,5 μ g ADN/1.105 cellules respectivement dans les expériences 1 et 2.

Exemple 34 :

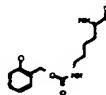
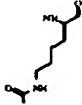
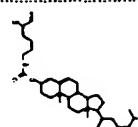
10

Influence de la structure du spacer sur l'efficacité de transfection (6) RPR 120535.

Dans des conditions d'expérimentation identiques à celles décrites dans l'exemple précédent, mais avec l'introduction d'une lignée supplémentaire (cellules 3LL), nous 15 avons comparé les efficacités de transfection obtenues avec le lipide cationique (6) RPR120535 modifié par substitution sur le « spacer » avec un groupement type Arg, type Lys ou type Glu.

20

Les structures des différents spacers sont comme suit:

N° RPR	SPACER
120531	Arg
121650	Arg(Z ₂)
127888	Lys
122759	
122760	
128142	

120535	Gly
123027	GluOBz
126097	Glu

Les efficacités de transfection sont données en RLU/10s./2.103 cellules traitées.

Des plasmides différents ont été utilisés pour les expériences 1 et 2, à dose de 0,5µg
5 et 1µg ADN/1.105 cellules respectivement dans les expériences 1 et 2. De l'analyse des résultats, il ressort que selon les cellules considérées, la présence d'une chaîne d'acide aminé de préférence substituée induit une meilleure efficacité de transfection.

	lipide	Cells HeLa	Cellules NIH3T3	Cellules 3LL
experience 1	RPR120535	1,0.10 ⁶ ± 1.9.10 ⁵	6,5.10 ⁷ ± 4,8.10 ⁶	
	RPR120531	3,7.10 ⁵ ± 1,0.10 ⁵	1,6.10 ⁷ ± 2,0.10 ⁶	
	RPR121650	2,6.10 ⁶ ± 1,8.10 ⁵	9,1.10 ⁷ ± 2,7.10 ⁷	
experience 2	RPR120535	2,2.10 ⁶ ± 3,3.0 ⁵	1,7.10 ⁶ ± 1,0.10 ⁵	
	RPR127888	3,1.10 ⁵ ± 2,9.10 ⁴	1,4.10 ⁵ ± 1,7.10 ⁴	
	RPR122760	1,4.10 ⁶ ± 2,2.10 ⁵		
	RPR122759	7,7.10 ⁵ ± 1,1.10 ⁵	3,7.10 ⁵ ± 5,4.10 ⁴	
	RPR128142	6,3.10 ⁶ ± 6,3.10 ⁵	9,1.10 ⁴ ± 9,3.10 ³	
	RPR126097	3,6.10 ⁶ ± 3,6.10 ⁵		3,0.10 ⁵ ± 2,3.10 ⁴
	RPR123027	1,0.10 ⁶ ± 4,1.10 ⁴		6,9.10 ⁵ ± 1,1.10 ⁵

TABLEAU II

EXAMPLE 34Influence de la présence de DOPE dans le mélange lipofectant/ADN (9) RPR 120531A

5

Selon le même protocole que celui utilisé dans l'exemple 31 il est ajouté de la DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamine) au lipide cationique (9) RPR 120531A à des rapports molaires variables avant addition du DNA dans le mélange de transfection.

10 L'activité luciférase est dosée dans le surnageant après lyse des cellules et rapportée au mg de protéine (figure 5).

La présence de DOPE dans les mélanges lipofectants permet d'améliorer l'efficacité de transfection quand la concentration en (9) RPR 120531A est faible.

15

EXAMPLE 35Effet du sérum sur l'efficacité de transfection (6) RPR 120535A, (9) RPR 120531A et (10) RPR 121650A

Des échantillons de 1.10^5 cellules [NIH 3T3 ou Hela] en phase exponentielle de croissance sur 2 cm^2 sont traités par des solutions lipofectant/pCMV-LUC (3 nanomoles lipofectant/ μg ADN) en absence de sérum pendant 2 heures ou en présence de sérum dans le milieu de culture. Dans cet exemple chaque échantillon reçoit 2 μg d'ADN. L'expression de la luciférase est recherchée dans le surnageant des lysats cellulaires, exprimée en RLU/10s. et rapportée au mg de protéine. De l'analyse des résultats, il ressort que la présence de sérum n'a pas d'effet notable sur la transfection.

25

EXAMPLE 36Influence de la concentration en acide nucléique dans les mélanges ADN/lipofectant (20)RPR 120527A, (19)RPR 120528A, (17) RPR 120526A et (16) RPR 120525A

30

Dans les conditions décrites dans l'exemple 31 des échantillons de cellules NIH 3T3 sont transfectées dans des conditions où les ratios nanomoles lipofectant/ μg d'ADN sont optimisés - voir exemple 32 - [ratio = 6 pour (20)RPR 120527A et (19)RPR 120528A - ratio = 3 pour (17)RPR 120526A et (16)RPR 120525A]. Les

quantités d'ADN apportées à chaque échantillon varient de 0,5 à 2 µg. Les résultats sont reportés dans la figure 6.

La transfection de 1.10^5 cellules en phase exponentielle de croissance avec 1 µg d'ADN plasmidique semble un bon choix ; en effet l'augmentation de la quantité 5 d'ADN utilisé entraîne une augmentation de la concentration en lipide cationique au contact des cellules et donc des problèmes de toxicité dans certains cas. A plus faible concentration en ADN la proportionnalité avec l'efficacité de transfection n'est plus obtenue.

10

EXEMPLE 37

Essais de transfection *in vivo* avec des lipopolyamines selon l'invention.

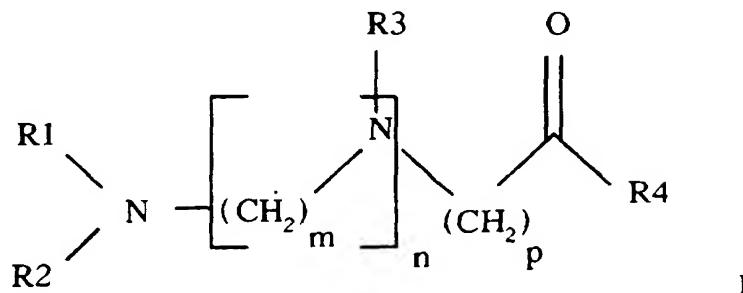
15 On procède à une injection d'une solution contenant une lipopolyamine selon l'invention, préparée comme décrit ci-dessus, dans la tumeur 7 jours après implantation, la souris étant anesthésiée avec un mélange Kétamine + Xylazine. Deux jours après l'injection, on prélève du tissus tumoral, qui est pesé puis haché et broyé dans 500 µl tampon de lyse (Promega Cell Lysis Buffer E153 A). Après 20 centrifugation (20 000 g pendant 10 minutes), on prélève 10 µl qui servent à l'évaluation de l'activité luciférase par mesure de l'émission lumineuse totale obtenue après mélange avec 50 µl de réactif (Promega Luciferase Assay Substrate) dans un luminomètre Lumat LB 9501 (Berthold), intégration sur 10 secondes.L'activité résultante est exprimée en RLU (Relative Lights Units) estimés dans la totalité du 25 surnageant de lyse tumorale, ou en RLU par µg d'ADN injecté. le tableau III rend compte des résultats obtenus.

Plasmide référence	μg/ tumeur	[ADN] μg/μl	Peptide		Lipide Cationique référence	n	
			référence	pept/ADN w/w			
pXL2622	10	0,5	(KTPKKAKKP), «	1,5 (9)	3 (6)	679 258 395 433	414 286 219 333
pXL2622	10	0,5	«	«	«	67 994 59 209	82 527 54 375
pXL2622	10	0,5	«	«	«	«	8 9
pXL2622	10	0,5	«	«	«	«	10 10

TABLEAU III

REVENDICATIONS

1. Lipopolyamine, sous forme D, L ou LD et ses sels, caractérisée en ce qu'elle
 5 est représentée par la formule générale I



Dans laquelle :

R1, R2 et R3 représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement -(CH₂)_q-NRR' avec

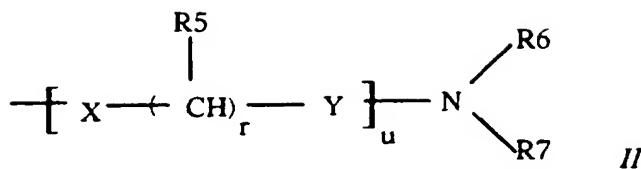
10 q pouvant varier entre 1, 2, 3, 4, 5 et 6 ceci de manière indépendante entre les différents groupements R1, R2 et R3 et

R et R' représentant indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un groupement -(CH₂)_{q'}-NH₂, q' pouvant varier entre 1, 2, 3, 4, 5 et 6 ceci de manière indépendante entre les différents groupements R et R',

15 m, n et p représentent, indépendamment l'un de l'autre, un nombre entier pouvant varier entre 0 et 6 avec lorsque n est supérieur à 1, m pouvant prendre des valeurs différentes et R3 des significations différentes au sein de la formule générale I et

R4 représente un groupement de formule générale II

59



dans laquelle:

R6 et R7 représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un radical aliphatique, saturé ou non, en C10 à C22 avec au moins l'un des deux 5 groupements étant différent de l'hydrogène,

u est un nombre entier choisi entre 0 et 10 avec lorsque u est un entier supérieur à 1 R5, X, Y et r pouvant avoir des significations différentes au sein des différents motifs [X-(CHR5)r-Y]

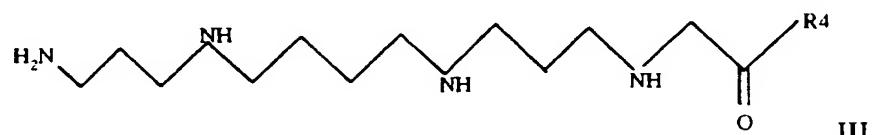
X représente un atome d'oxygène, de soufre ou un groupement amine monoalkylé ou 10 non,

Y représente un groupement carbonyle ou un groupement méthylène

R5 représente un atome d'hydrogène ou une chaîne latérale d'acide aminé naturel , le cas échéant substituée et

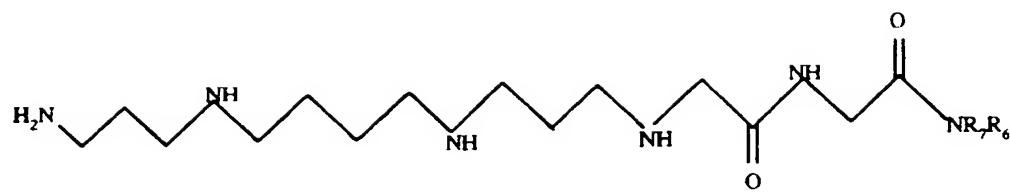
r représente un entier variant entre 1 et 10 avec lorsque r est égal à 1, R5 représentant 15 une chaîne latérale d'acide aminé naturel substitué ou non et lorsque r est supérieur à 1, R5 représentant un atome d'hydrogène.

2. Lipopolyamine selon la revendication 1 caractérisée en ce qu'elle est représentée par l'une des sous formules suivantes



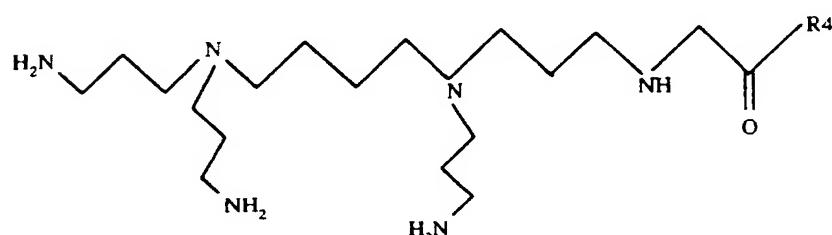
20

60

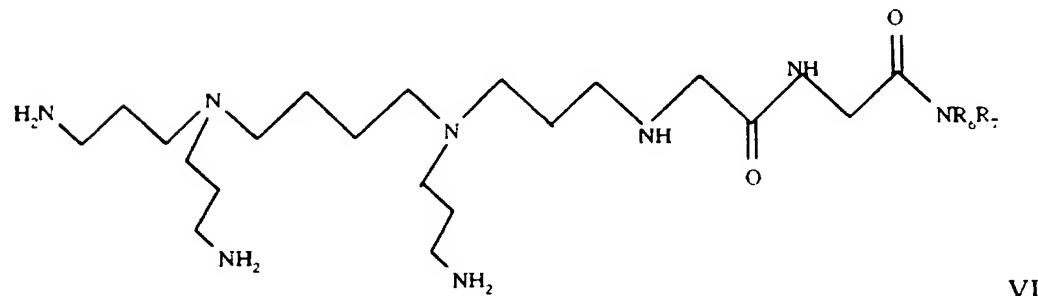


IV

5

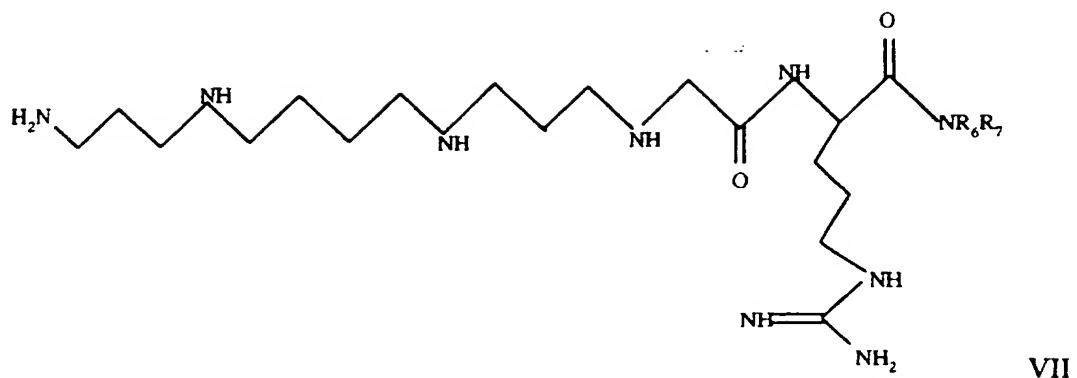


V

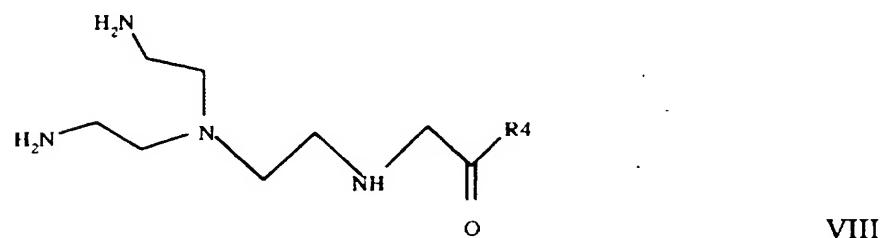


VI

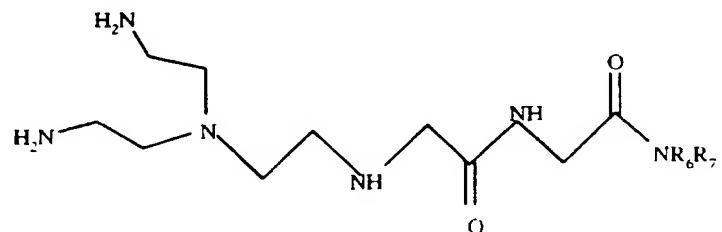
61



VII

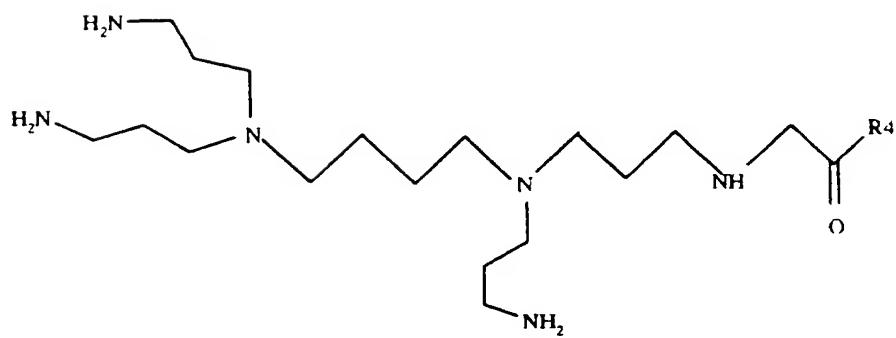


VIII

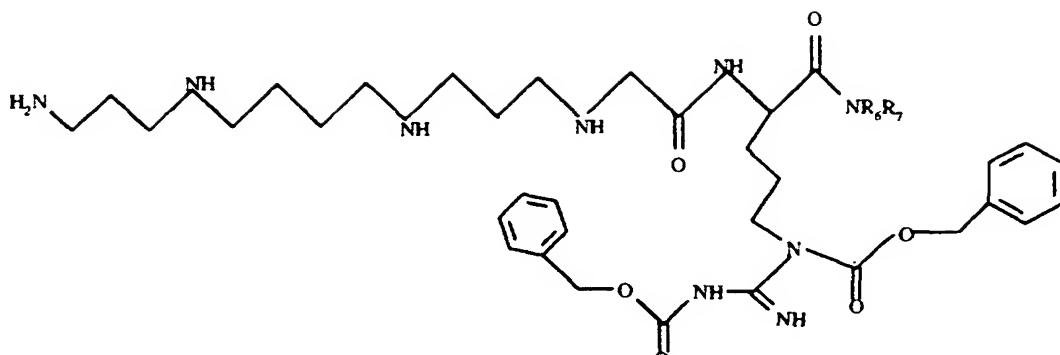


IX

5



X



dans lesquelles R4, R6 et R7 sont définis comme en revendication 1.

5 3. Lipopolyamine selon la revendication 2 caractérisée en ce que R4 y représente un groupement NR₆R₇ avec R₆ et R₇ figurant dans les sous formules III à XII un groupement identique choisi parmi (CH₂)₁₇ CH₃, (CH₂)₁₁ CH₃, (CH₂)₁₃ CH₃ ou (CH₂)₁₂ CH₃.

10 4. Lipopolyamine selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce qu'elle est associée à un élément de ciblage extra ou intracellulaire.

15 5. Lipopolyamine selon la revendication 4 caractérisée en ce qu'elle incorpore l'élément de ciblage au niveau de la chaîne latérale d'acide aminé figurée par le substituant R₅.

6. Lipopolyamine selon la revendication 4 ou 5 caractérisée en ce qu'il s'agit d'un ligand de récepteur cellulaire présent à la surface du type cellulaire ciblé.

20 7. Lipopolyamine selon l'une des revendications 4 à 6 caractérisée en ce que cet élément de ciblage est choisi parmi des sucres, des peptides tels que des anticorps ou fragments d'anticorps, des ligands de récepteurs cellulaires ou des fragments de ceux-ci, des récepteurs ou fragments de récepteurs tels que des ligands de récepteurs de facteurs de croissance, de récepteurs de cytokines, de récepteurs de lectines

cellulaires ou de récepteurs de protéines d'adhésion de type intégrines, de récepteur de la transferrine, des lipides HDL ou LDL et/ou des oligonucléotides.

8. Lipopolyamine selon l'une des revendications 4 ou 5 caractérisée en ce que cet élément de ciblage est représentée par une séquence signal de localisation 5 nucléaire.

9. Lipopolyamine selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce qu'elle incorpore un agent marqueur de type biotine, rhodamine, folate ou une séquence peptidique ou pseudopeptidique linéaire ou cyclique comportant l'épitope Arg-Gly-Asp au niveau de la chaîne latérale d'acide aminé figurée par R5.

10 10. Lipopolyamine selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi :

H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COGlyN[(CH₂)₁₇-CH₃]₂
 H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂CON[(CH₂)₁₇-CH₃]₂
 H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COArgN[(CH₂)₁₇-CH₃]₂
 15 H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COArg(Z)₂N[(CH₂)₁₇-CH₃]₂
 H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COLys(rhodamine)N[(CH₂)₁₇-CH₃]₂
 H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COLys(biotinyl)N[(CH₂)₁₇-CH₃]₂
 {H₂N(CH₂)₃}₂N(CH₂)₄N{(CH₂)₃NH₂} (CH₂)₃NHCH₂COGlyN[(CH₂)₁₇-CH₃]₂
 {H₂N(CH₂)₃}₂N(CH₂)₄N{(CH₂)₃NH₂} (CH₂)₃NHCH₂CON[(CH₂)₁₇-CH₃]₂
 20 {H₂N(CH₂)₂}₂N(CH₂)₂NHCH₂COGlyN[(CH₂)₁₇-CH₃]₂
 {H₂N(CH₂)₂}₂N(CH₂)₂NHCH₂CON[(CH₂)₁₇-CH₃]₂
 H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COGlyN[(CH₂)₁₇]₂
 H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂CON[(CH₂)₁₇]₂
 H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COArgN[(CH₂)₁₇]₂
 25 H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COArg(Z)₂N[(CH₂)₁₇-CH₃]₂
 H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COLys(rhodamine)N[(CH₂)₁₇-CH₃]₂
 H₂N(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NHCH₂COLys(biotinyl)N[(CH₂)₁₇-CH₃]₂
 {H₂N(CH₂)₃}₂N(CH₂)₄N{(CH₂)₃NH₂} (CH₂)₃NHCH₂COGlyN[(CH₂)₁₇-CH₃]₂
 {H₂N(CH₂)₃}₂N(CH₂)₄N{(CH₂)₃NH₂} (CH₂)₃NHCH₂CON[(CH₂)₁₇-CH₃]₂
 30 {H₂N(CH₂)₂}₂N(CH₂)₂NHCH₂COGlyN[(CH₂)₁₇-CH₃]₂
 {H₂N(CH₂)₂}₂N(CH₂)₂NHCH₂CON[(CH₂)₁₇-CH₃]₂
 NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄N{(CH₂)₃NH₂} CH₂COGlyN[(CH₂)₁₇-CH₃]₂

$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COLysN}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COLys [Cl-Z]N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COLys [CHO]N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COLys [Cholesteryl]N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
5 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COLys [Arachidonyl]N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGluN}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu [N(CH}_3)_2\text{]N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu [O-Bz]N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu [Galactosamide]N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
10 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu [Glucosamide]N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu [Mannosamide]N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CON}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_5\text{CON}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlyN}[(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3]_2$
15 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlyN}[(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3]_2$ et
 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlyN}[(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3]_2.$

11. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient au moins
20 une lipopolyamine selon l'une des revendications 1 à 10 et au moins un acide
nucléique.

12. Composition selon la revendication 11 caractérisée en ce que l'acide
nucléique est un acide désoxyribonucléique.

13. Composition selon la revendication 11 caractérisée en ce que l'acide
25 nucléique est un acide ribonucléique.

14. Composition selon la revendication 11, 12 ou 13 caractérisée en ce que
l'acide nucléique est modifié chimiquement.

15. Composition selon l'une des revendications 11 à 14 caractérisée en ce que
l'acide nucléique est un antisens.

30 16. Composition selon l'une des revendications 11 à 14 caractérisée en ce que
l'acide nucléique comporte un gène thérapeutique.

17. Composition pharmaceutique comprenant un acide nucléique, une lipopolyamine selon l'une des revendications 1 à 6 et un adjuvant capable de s'associer au complexe lipopolyamine/acide nucléique et/ou d'améliorer son pouvoir transfectant.

18. Composition selon la revendication 17 caractérisée en ce que l'adjuvant
5 est un ou plusieurs lipides neutres.

19. Composition selon la revendication 18 caractérisée en ce que le ou les lipides neutres sont choisis parmi les lipides synthétiques ou naturels, zwitterioniques ou dépourvus de charge ionique dans les conditions physiologiques.

20. Composition selon la revendication 19 caractérisée en ce que le ou les
10 lipides neutres sont des lipides à 2 chaînes grasses.

21. Composition selon la revendication 19 ou 20 caractérisée en ce que le ou les lipides neutres sont choisis parmi la dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), l'oléoyl-palmitoylphos-phatidyléthanolamine (POPE), le di-stéaryl, -palmitoyl, -mirystoyl phosphatidyléthanolamine ainsi que leurs dérivé N-méthylés 1 à 3 fois; les
15 phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les cérébrosides (tels que notamment les galactocérebrosides), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines) et les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et GM2).

22. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 11 à
20 21 caractérisée en ce que l'adjuvant est ou comprend un composé intervenant au niveau de la condensation dudit acide nucléique

23. Composition pharmaceutique selon la revendication 22 caractérisée en ce que ledit composé dérive en tout ou partie d'une histone, d'une nucléoline et/ou d'une protamine.

25
24. Composition pharmaceutique selon la revendication 22 caractérisée en ce que ledit composé est constitué en tout ou partie, de motifs peptidiques (KTPKKAKKP) et/ou (ATPAKAKAA) répétés de manière continue ou non, le nombre des motifs pouvant varier entre 2 et 10.

25. Composition selon l'une des revendications 11 à 24 caractérisée en ce qu'elle comprend de 0,01 à 20 équivalents d'adjuvant pour un équivalent d'acide nucléique en poids/poids et, plus préférentiellement, de 0,5 à 5.

26. Composition selon l'une quelconque des revendications 11 à 25 caractérisée en ce qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable.

27. Composition selon l'une quelconque des revendications 11 à 25 caractérisée en ce qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une application sur la peau et/ou les muqueuses.

10 28. Utilisation d'une lipopolyamine selon l'une des revendications de 1 à 10 pour la transfection *in vivo* ou *in vitro* de cellules.

15 29. Procédé d'une lipopolyamine selon l'une des revendications 1 à 10 caractérisé en ce qu'il met en oeuvre le couplage d'au moins une fraction lipidique à au moins une fraction polyamine assymétrique, ladite fraction polyamine ayant au préalable été obtenue par réaction bimoléculaire entre un agent alkylant lié covialement à un support solide et une polyamine symétrique.

20 30. Procédé selon la revendication 29 caractérisé en ce que le couplage de la fraction lipidique à la fraction polyamine assymétrique est effectuée au niveau du support solide auquel est fixée ladite fraction polyamine assymétrique et en ce que l'on récupère ladite lipopolyamine ainsi obtenue.

31. Procédé selon la revendication 30 caractérisé en ce qu'il met en outre en oeuvre l'introduction d'agents marqueurs, de sucres ou de sondes fluorescentes sur la lipopolyamine, fixée ou non sur le support solide.

1 / 6

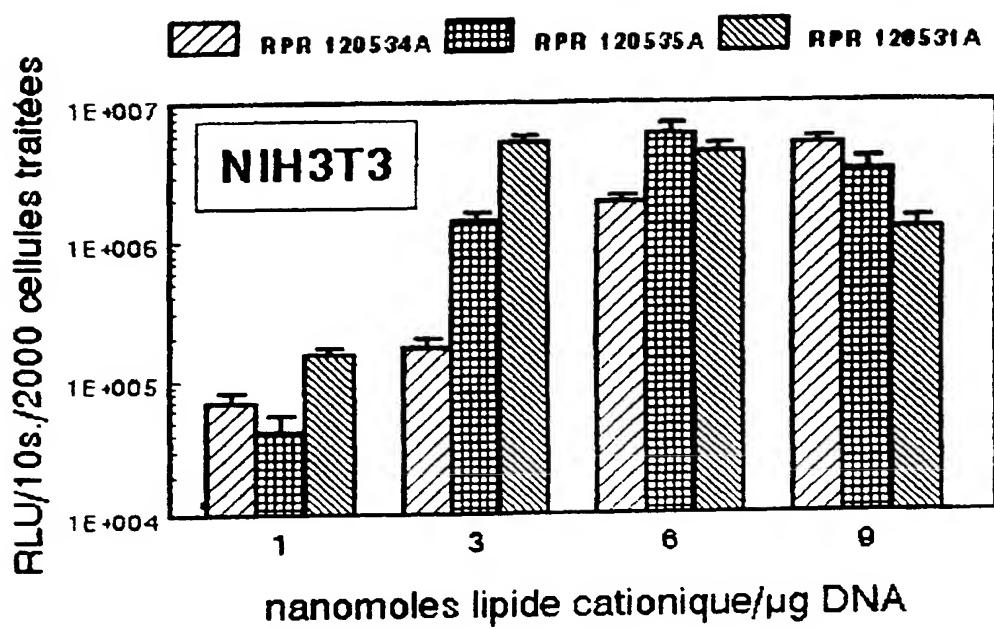


Figure 1

2 / 6

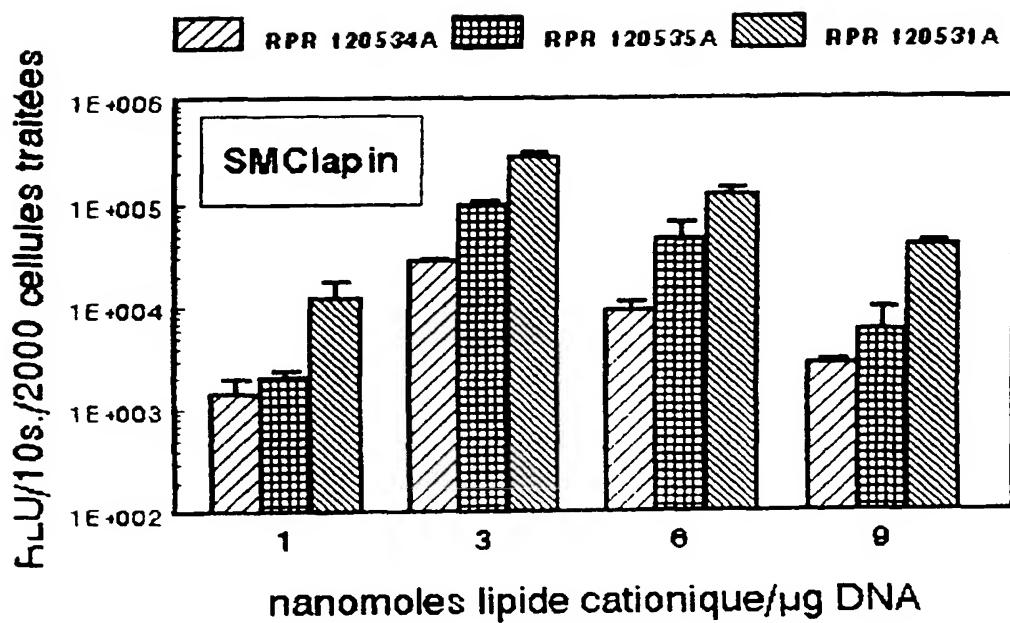


Figure 2

3/6

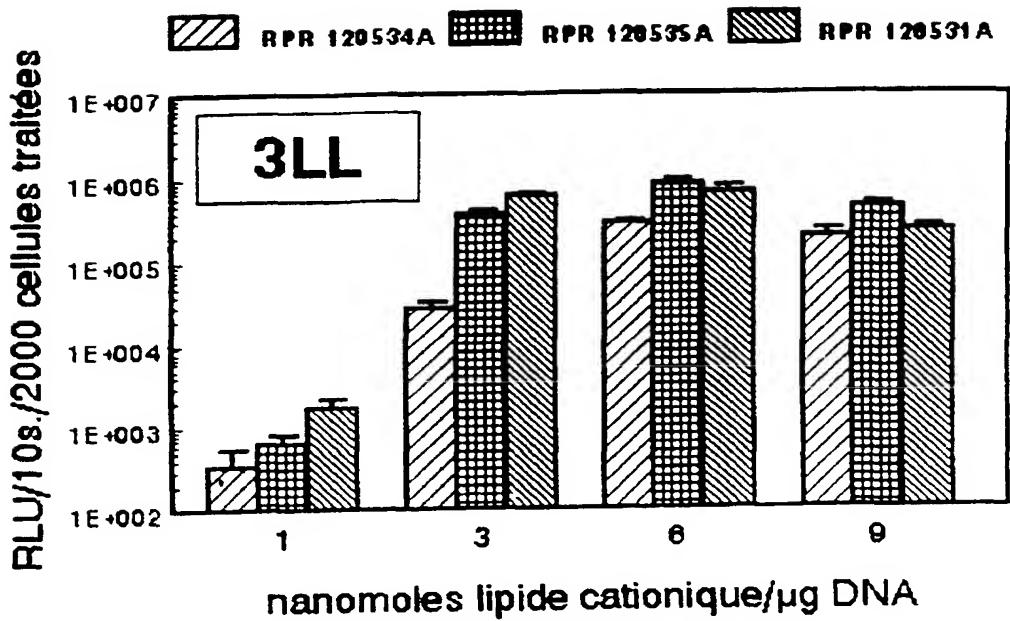


Figure 3

4/6

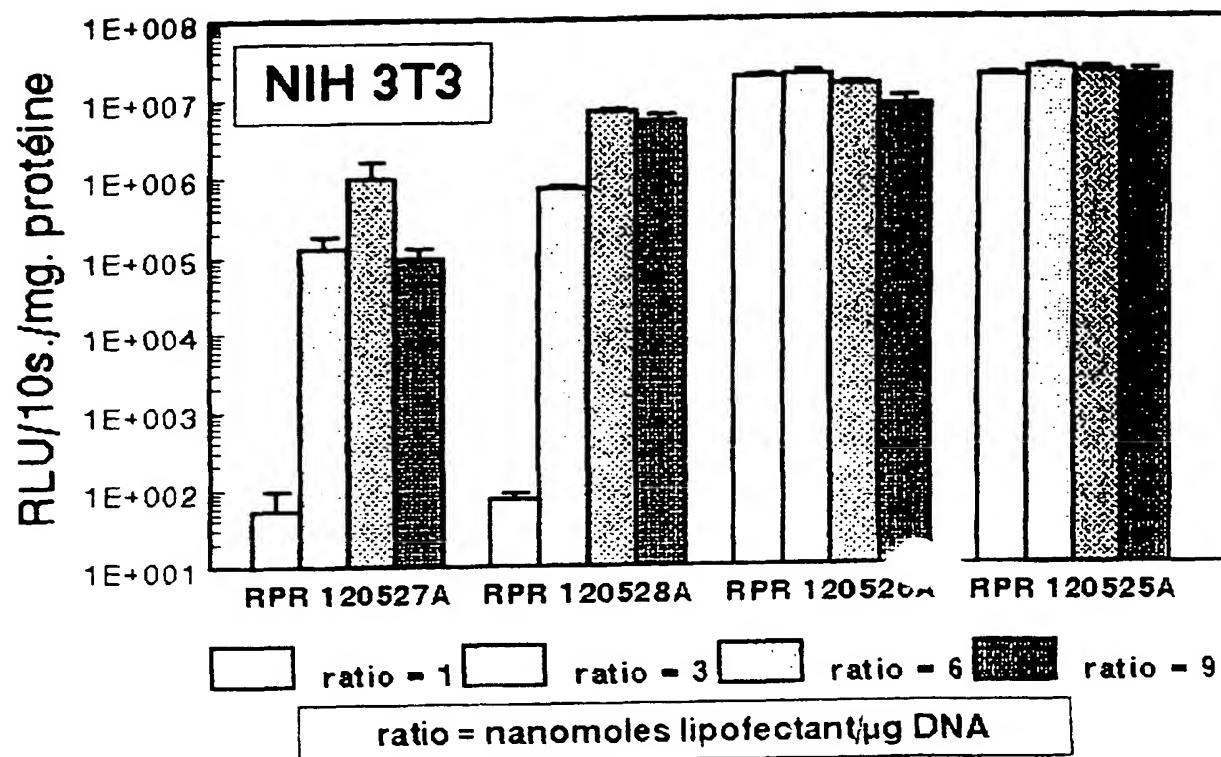


Figure 4

5 / 6

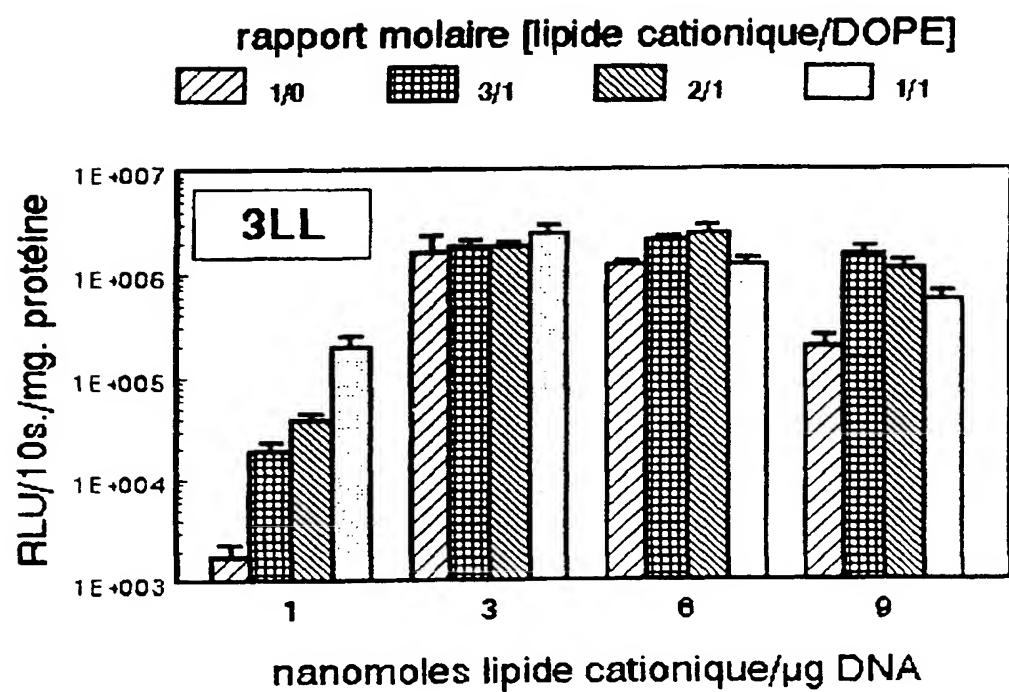


Figure 5

6 / 6

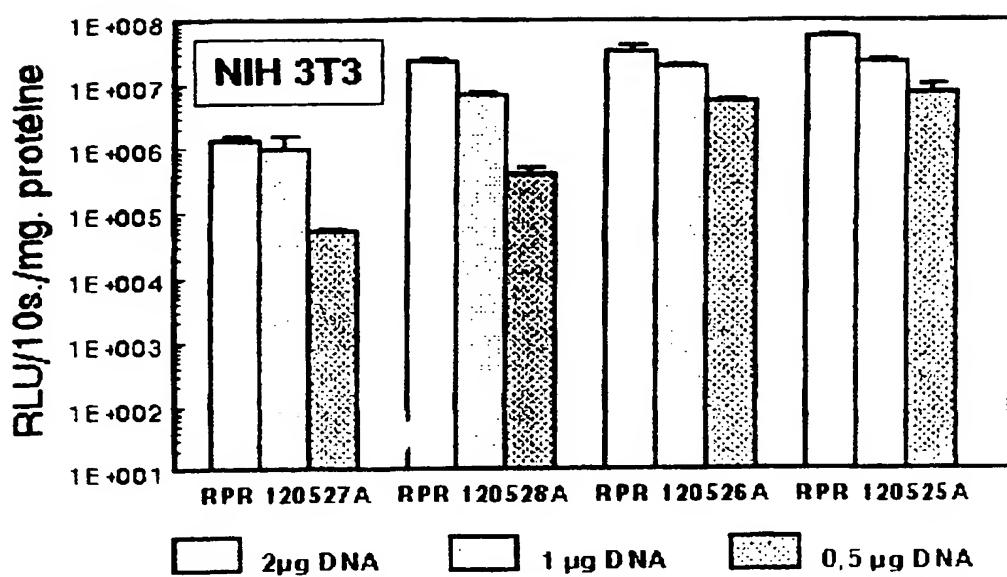


Figure 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No
PCT/FR 96/01774

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C07C237/06 C07K5/06
 A61K48/00

A61K47/48 C12N15/87 C12N15/88

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 C07C C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 394 111 A (CENTRE NAT RECH SCIENT) 24 October 1990 see claims; examples ---	1-3,10, 28
A	WO 95 18863 A (RHONE POULENC RORER SA ;BEHR JEAN PAUL (FR); DEMENEIX BARBARA (FR)) 13 July 1995 see claims 1,6-10,13-17,20-22 ---	1,11-21, 25-28
A	WO 94 05624 A (LIFE TECHNOLOGIES INC) 17 March 1994 see page 8, line 2 - line 19 ---	1,4-9,28
P,X	WO 96 25508 A (RHONE-POULENC RORER S.A., FR.) 22 August 1996 see page 11, line 13 - line 23; claims -----	1-31

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *'E' earlier document but published on or after the international filing date
- *'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *'&' document member of the same patent family

2

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 February 1997	24.02.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Seufert, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 96/01774

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see annex

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6 4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational Application No
PCT/FR 96/01774

The large number of theoretically possible compounds resulting from the combination of all the claimed substituents prevents a complete search from being made for all the compounds according to claim 1. For reasons of economy, the search has been restricted to the following case:

the variables p and n of the general formula are the integer 1 or higher, m is the integer 2 or higher, and one of the substituents R1 and R2 is different from hydrogen.
(See Examination Guidelines, part B, chapter III, 3.6, 3.7).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internal Application No

PCT/FR 96/01774

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0394111	24-10-90	FR-A-	2645866	19-10-90
		CA-A-	2014518	17-10-90
		FR-A-	2646161	26-10-90
		IL-A-	94077	29-12-94
		JP-A-	2292246	03-12-90
		US-A-	5476962	19-12-95
		US-A-	5171678	15-12-92
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9518863	13-07-95	FR-A-	2714830	13-07-95
		AU-A-	1458395	01-08-95
		CA-A-	2180872	13-07-95
		EP-A-	0738328	23-10-96
		FI-A-	962799	09-07-96
		NO-A-	962791	02-07-96
		ZA-A-	9500137	09-09-95
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9405624	17-03-94	US-A-	5334761	02-08-94
		EP-A-	0656883	14-06-95
		JP-T-	8509953	22-10-96
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9625508	22-08-96	FR-A-	2730637	23-08-96
		AU-A-	4835396	04-09-96
-----	-----	-----	-----	-----

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 96/01774

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C07C237/06 C07K5/06
A61K47/48 C12N15/87 C12N15/88
A61K48/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C07C C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications vues
A	EP 0 394 111 A (CENTRE NAT RECH SCIENT) 24 Octobre 1990 voir revendications; exemples ---	1-3,10, 28
A	WO 95 18863 A (RHONE POULENC RORER SA ;BEHR JEAN PAUL (FR); DEMENEIX BARBARA (FR)) 13 Juillet 1995 voir revendications 1,6-10,13-17,20-22 ---	1,11-21, 25-28
A	WO 94 05624 A (LIFE TECHNOLOGIES INC) 17 Mars 1994 voir page 8, ligne 2 - ligne 19 ---	1,4-9,28
P,X	WO 96 25508 A (RHONE-POULENC RORER S.A., FR.) 22 Août 1996 voir page 11, ligne 13 - ligne 23; revendications -----	1-31

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

2

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 14 Février 1997	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 24.02.97
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax (+ 31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Seufert, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

Fu/FR 96/01774

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants.

1. Les revendications n°^s se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. Les revendications n°^s se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
Voir page suivante
3. Les revendications n°^s sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs invenus dans la demande internationale, à savoir:

1. Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y rattachent ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°^s:
4. Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°^s:

Remarque quant à la réserve

Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
 Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No. PCT/FR 96/01774

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/

Le nombre élevé de composés théoriquement concevables qui résultent de la combinaison de tous les substituants revendiqués empêche une recherche complète pour tous les composés selon revendication 1. Pour des raison d'économie la recherche a été limitée au cas suivant:

les variables p et n de la formule générale représentent un nombre entier égal ou supérieur à 1, m représente un nombre entier égal ou supérieur à 2 et l'un des substituants R1 et R2 est différent de l'hydrogène.

(voir Directives Relatives à l'Examen part B, chapitre III, 3.6, 3.7)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No
PCT/FR 96/01774

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
EP-A-0394111	24-10-90	FR-A- 2645866 CA-A- 2014518 FR-A- 2646161 IL-A- 94077 JP-A- 2292246 US-A- 5476962 US-A- 5171678		19-10-90 17-10-90 26-10-90 29-12-94 03-12-90 19-12-95 15-12-92
WO-A-9518863	13-07-95	FR-A- 2714830 AU-A- 1458395 CA-A- 2180872 EP-A- 0738328 FI-A- 962799 NO-A- 962791 ZA-A- 9500137		13-07-95 01-08-95 13-07-95 23-10-96 09-07-96 02-07-96 09-09-95
WO-A-9405624	17-03-94	US-A- 5334761 EP-A- 0656883 JP-T- 8509953		02-08-94 14-06-95 22-10-96
WO-A-9625508	22-08-96	FR-A- 2730637 AU-A- 4835396		23-08-96 04-09-96